



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a antibióticos en aislados de Escherichia coli de muestras ambientales de granjas porcinas

Autor/es

ISABEL BENITO CASTELLANOS

Director/es

CARMEN TORRES MANRIQUE

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Química

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2017-18



Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a antibióticos en aislados de Escherichia coli de muestras ambientales de granjas porcinas, de ISABEL BENITO CASTELLANOS

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Facultad de Ciencia y Tecnología

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a
antibióticos en aislados de *Escherichia coli* de muestras
ambientales de granjas porcinas

Realizado por:

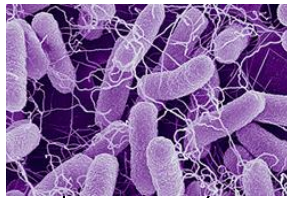
Isabel Benito Castellanos

Tutelado por:

Carmen Torres Manrique

Logroño, Junio, 2018

Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a antibióticos en aislados de *Escherichia coli* de muestras ambientales de granjas porcinas



Autora: Isabel Benito Castellanos

Tutora: Carmen Torres manrique

Titulación: Grado en Química

Facultad de Ciencias y Tecnología

Universidad de La Rioja

Curso académico 2017/2018

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1. RESUMEN.....	2
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1 Descubrimiento de los antibióticos.....	4
3.1.1. Estrategias de resistencia a los antibióticos.....	5
3.2. Tipos de antibióticos.....	5
3.2.1. β -lactámicos	6
3.2.1.1. Mecanismo de acción en la pared celular.....	7
3.2.2. Polimixinas.....	7
3.3. Uso clínico y no clínico de los antibióticos	8
3.4. <i>Escherichia coli</i>	8
3.5. Mecanismos de resistencia a los β -lactámicos.....	9
3.5.1. β -lactamasas de espectro extendido	9
3.5.1.1. BLEEs de la clase CTX-M	11
4. OBJETIVOS.....	13
5. MATERIAL Y MÉTODOS	14
5.1. Cepas de <i>E. coli</i> incluidas en el estudio.....	14
5.2. Identificación de las cepas por MALDI-TOF.....	14
5.3. Cepas de referencia.....	15
5.4. Medios de cultivo empleados.....	15
5.5. Determinación de la sensibilidad a antibióticos.....	15
5.5.1. Antibióticos estudiados	16
5.5.2. Difusión en agar. Antibiograma	16
5.5.3. Determinación fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLLEE). Test de doble disco.....	18
5.5.4. Estudio de la sensibilidad a colistina mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).	19
5.6. Extracción del DNA.....	19
5.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	20
5.8. Electroforesis en gel de agarosa.....	23
5.9. Secuenciación	24
5.10. Determinación del grupo filogenético	25

6. RESULTADOS	26
6.1. Identificación de las cepas	26
6.2. Determinación de la sensibilidad a antibióticos.....	26
6.2.1. Método de difusión en agar (antibiograma)	26
6.3. Estudio de BLEES en las cepas aisladas.....	30
6.3.1. Estudio genotípico por la técnica de PCR.....	32
6.3.2. Determinación de la variante del gen blaCTX-M del grupo 9 por secuenciación.	33
6.3.3. Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a colistina en las cepas BLEE positivas.	37
6.4. Identificación de los grupos filogenéticos de las cepas BLEE--positivas	38
7. DISCUSIÓN.....	41
8. CONCLUSIÓN	45
9. BIBLIOGRAFÍA.....	46

ABREVIATURAS

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
BLEE	Beta-lactamasas de espectro extendido
PCR	Polimerase Chain Reaction: reacción en cadena de la Polimerasa
DNA	Deoxyribonucleic acid: ácido desoxirribonucleico
PBP	Penicillin-binding proteins: proteínas de unión a penicilina
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo
AMP	Ampicilina
AMC	Amoxicilina-ácido clavulánico
FOX	Cefoxitina
CAZ	Ceftazidima
COL	Colistina
CTX	Cefotaxima
TET	Tetraciclina
CHL	Cloranfenicol
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
GEN	Gentamicina
CIP	Ciprofloxacina
STR	Streptomycin
dNTP	Desoxinucleótidos
TBE	Tris Boro EDTA
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
C+	Control positivo
C-	Control negativo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
C	Citosina
A	Adenina
G	Guanina
T	Timinina

1. RESUMEN

La resistencia a los antibióticos es un problema de dimensión global que afecta no solo a las bacterias patógenas, sino también a las bacterias comensales de diferente ámbito. En este trabajo se ha realizado el estudio fenotípico y genotípico de resistencia a antibióticos en 38 cepas de *Escherichia coli* aisladas previamente de lodos y aire de dos granjas porcinas (una intensiva y otra semi-intensiva). Se ha realizado re-identificación de los aislados mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF, Bio-Typer) y se ha determinado la sensibilidad a 12 antibióticos de diferentes familias por la técnica de difusión en agar (antibiograma). Se ha determinado la producción de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) mediante el test de doble disco (amoxicilina-ácido clavulánico-cefotaxima-ceftazidima) se ha estudiado mediante PCR y secuenciación la presencia de genes codificantes de BLEEs, así como las variantes alélicas de los mismos. En las cepas BLEEs positivas se ha determinado: 1) su grupo filogenético; 2) la sensibilidad a colistina y la presencia del gen *mcr-1* por PCR en las cepas resistentes a este antibiótico. Mas del 65% de las cepas presentaron resistencia a ampicilina, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol, y el fenotipo de multiresistencia fue evidenciado en el 68% de las cepas. En 12 de las 38 cepas (31,5%) se detectó producción de BLEEs identificándose por secuenciación el gen responsable: *bla*_{CTX-M-14}. Todas estas cepas fueron tipadas en el filogrupo B1, además, todas menos una fueron resistentes a la colistina ($\text{CMI} \geq 4\mu\text{g/ml}$). El gen *mcr-1* fue detectado en 7 de las 11 cepas BLEE-positivas resistentes a colistina. Las 3 cepas restantes podrían tener otras variantes *mcr* minoritarias o un nuevo mecanismo de resistencia.

En conclusión, el aire y lodos de granjas porcinas puede ser vehículo de transferencia de cepas de *E. coli* con mecanismos de resistencia de importancia en salud pública como son las BLEEs o al gen *mcr-1*.

2. ABSTRACT

The antibiotic resistance is a global problem, which affects not only to pathogenic bacteria but also to commensal bacteria from different ecosystems. This work has been based on the phenotypic and genotypic study of antibiotic resistance in 38 *Escherichia coli* isolates recovered from the air and slurry of two porcine farms (an intensive exploitation farm and a semi-free-range regimen farm). The re-identification of the isolates was performed using mass-spectrometry (MALDI-TOF, Biotyper) and the antimicrobial susceptibility testing was determined by disk-diffusion method for 12 antimicrobials (antibiogram). The production of extended spectrum β -lactamases (ESBL) was determined using double-disk synergy test (amoxicillin-clavulanic acid - cefotaxime-ceftazidime) and the identification of the genes involved in β -lactam, as well as the allelic variants, was studied by PCR and subsequent sequencing. The phylogenetic groups, the susceptibility to colistin and the presence of the *mcr-1* gene was studied in ESBL-producing strains. More than 65% of the isolates showed resistance to ampicillin, tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole, and 68% of the strains exhibited a multiresistance phenotype. ESBL-production was detected in 12 out of 38 strains (31.5%) and the mechanism involved was mediated by *bla*_{CTX-M-14}. All these strains were ascribed to phylogenetic group B1, all but one strains were resistant to colistin (MIC $\geq 4\mu\text{g/ml}$). The *mcr-1* gene was detected in 7 of the 11 colistin-resistant ESBL-positive isolates. The remaining 3 strains could have other minority *mcr* variants or a new resistance mechanism.

In conclusion, pig farm air and slurry could acts as a vehicle of transmission for *E. coli* carrying important resistance mechanisms for public health, such as ESBL or the *mcr-1* gene.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Descubrimiento de los antibióticos

El desarrollo empírico de los antibióticos y el conocimiento de su mecanismo de acción no llegó hasta el siglo XX. Al principio de este siglo el biólogo alemán Rudolf von Emmerich descubrió un preparado capaz de destruir la bacteria del cólera (*Vibrio cholerae*). Este método no resultó del todo eficaz en el tratamiento de enfermedades. Unos años después el físico y químico Paul Erlich probó distintas sustancias químicas capaces de atacar a microorganismos patógenos. Descubrió el salvarsán “arsénico que salva”, compuesto de arsénico con acción selectiva frente a la bacteria responsable de la sífilis (*Treponema pallidum*).

Pero no fue hasta 1928 cuando la historia de los antibióticos comienza en realidad con el descubrimiento accidental de la penicilina por Alexander Fleming. Un hongo del género *Penicillium* había crecido en una de sus placas de cultivo con *Staphylococcus aureus*, inhibiendo el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, transcurrieron diez años hasta que la penicilina pudo ser purificada y producida en cantidades suficientes para su uso médico gracias al trabajo de otros científicos como Howard Florey y Ernst Chain.

El comienzo del uso clínico de antibióticos empezó en la Segunda Guerra Mundial. Diferentes empresas del Reino Unido plantearon la utilidad de la penicilina para el tratamiento de heridas de guerra y comenzaron a fabricarla a partir de cultivos de *Penicillium*.

La generalización del empleo de los antibióticos comenzó a partir de los años 50 y cambió de forma radical el panorama de las enfermedades infecciosas. También supuso un avance espectacular en el campo de la cirugía, permitiendo la realización de operaciones complejas y prolongadas sin un excesivo riesgo de infección.

Este uso generalizado de los antibióticos generó en contraposición la respuesta de las bacterias creando resistencia hacia estos antibióticos. Esta resistencia se produce simplemente por la evolución, la cual según Darwin se basa en la selección natural, solo sobreviven las más fuertes. De esta manera, el uso de antibióticos lo que provocó y lo que sigue provocando aún hoy en día, es la aceleración de esa selección natural.

Ante la presión selectiva del uso de los antibióticos, las bacterias deben desarrollar distintas estrategias para poder sobrevivir en la presencia de los mismos. Estas estrategias pueden ser de dos tipos (Torres, 2007):

- Mutaciones en genes intrínsecos, importantes para la acción del antibiótico, pero no letales para la bacteria.
- Adquisición de genes de resistencia a partir de otros microorganismos.

3.1.1. Estrategias de resistencia a los antibióticos

Como ya se ha mencionado, principalmente se encuentran dos estrategias de resistencia: una intrínseca y otra adquirida.

Por un lado, las bacterias pueden sufrir distintas mutaciones cromosómicas en genes que codifican la síntesis de proteínas esenciales para que el antibiótico actúe. Gracias a la rapidez en su división, a la elevada tasa de mutación y al azar, las bacterias pueden adquirir diversas mutaciones que le permitan sobrevivir en presencia de antibióticos dando lugar a una población resistente.

Por otro lado, se encuentra la captación de genes de resistencia exógenos, es decir, la bacteria puede adquirir material genético de otra bacteria (incluso de diferente género) que le permita sobrevivir en presencia de condiciones adversas, como la presencia de antibiótico. La bacteria puede adquirir el material genético por contacto físico directo con otras bacterias (conjugación), a través de poros en las paredes celulares (transformación) o a través de la infección con virus (transducción). Los plásmidos pueden ser transferidos por conjugación a través de la formación del *pilus sexual* que permite su transferencia de bacteria a bacteria. En el caso de la transformación, la bacteria receptora puede captar directamente el material genético, entre el que se encuentran los plásmidos que están libres en el entorno, a través de los poros en la pared.

La resistencia a los antibióticos puede generar clones multirresistentes capaces de dispersarse con gran facilidad, siendo éste el principal método de diseminación en los hospitales. Por otro lado, los genes de resistencia se pueden dispersar por "sistemas de movilización" en los que las bacterias almacenan los genes de resistencia en integrones y estos se transfieren en plásmidos (Torres, 2007).

3.2. Tipos de antibióticos

Existen diferentes familias de antibióticos, entre las que están los β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas o polimixinas, entre otros. Este trabajo se va a centrar en los β -lactámicos y en las polimixinas (como la colistina).

3.2.1. β -lactámicos

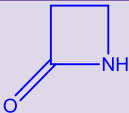
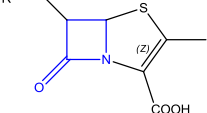
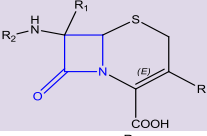
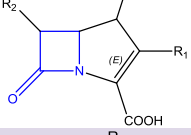
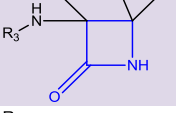
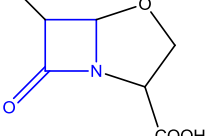
Esta familia de antibióticos es, sin duda, una piedra angular en la atención sanitaria mundial. Su mecanismo de acción se basa principalmente en su interacción con las proteínas de unión a penicilina (PBP), claves en la síntesis de la pared celular, provocando la inhibición de dicha síntesis de la pared celular bacteriana, y, por ende, la muerte celular.

Este mecanismo ha hecho que la penicilina y sus análogos sean los antibióticos más utilizados desde hace 70 años (Decuype *et al.*, 2018).

Este tipo de antibióticos están caracterizados por la presencia de un anillo β -lactámico en su estructura, siendo los más usados tanto a nivel clínico en humanos como en animales. Esta familia se subdivide en varios grupos: penicilinas, carbapenémicos, cefalosporinas, monobactámicos o inhibidores de β -lactamasas.

El espectro de actividad de los β -lactámicos depende de la estructura química de su anillo y de los sustituyentes.

Tabla 1. Estructura química de los antibióticos β -lactámicos (Suárez and Gudíol, 2009)

Estructura química	Anillo secundario	Anillo β -lactámico + anillo secundario	Grupo β -lactámicos
	Anillo β -lactámico	Anillo β -lactámico	
	Anillo tiazolidínico	Ácido 6-aminopenicilánico	Penicilinas
	Anillo dihidrotiacínico	Ácido 7- α -cefalosporínico	Cefalosporinas
	Anillo pirrolínico	Carbapenemo	Carbapenémicos
	Ninguno	Monobactamo	Monobactámicos
	Anillo oxazolidínico	Clavamo	Inhibidores

Los β -lactámicos actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana. Esta pared está formada principalmente por un heteropolímero peptidoglicano, unido a un pentapéptido del cual su extremo está compuesto por dos D-Alaninas.

3.2.1.1. Mecanismo de acción en la pared celular

El heteropolímero peptidoglicano se transporta hasta el espacio periplásmico y una vez allí se tiene que producir la unión de una cadena con otra, para esta función están las proteínas de unión a penicilina (PBP). Estas son las encargadas de unir las cadenas de aminoácidos laterales, liberando una de las dos D-alaninas que se encontraban en cada uno de los extremos de las cadenas pentapeptídicas.

En este punto es donde actúan los antibióticos β -lactámicos, ya que su estructura es muy parecida al extremo del peptidoglucano (unión D-alanina-D-alanina), por lo que compiten con este extremo para unirse a las PBP, lo cual bloquearía la síntesis de la pared. (Kong *et al.*, 2010)

3.2.2. Polimixinas

Las polimixinas son una familia de antibióticos que se comercializaron en la década de los cincuenta y sesenta, tanto para medicina como para su uso en granjas porcinas como promotores de crecimiento, pero cayeron posteriormente en desuso debido a su toxicidad y a la aparición de otros antibióticos activos frente a *Pseudomonas aeruginosa*. De hecho, su uso se había limitado al tratamiento de infecciones respiratorias causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes en pacientes con fibrosis quística. De los distintos tipos existentes, la colistina es la más usada actualmente.

La creciente aparición de infecciones producidas por bacterias Gram negativas multirresistentes, junto con la ausencia de disponibilidad de nuevos antibióticos activos en estas situaciones, ha generado la necesidad de su recuperación en la práctica clínica, por lo que fue re-comercializada en España en el año 2004, siendo ahora un antibiótico bastante generalizado.

Por esta razón, el estudio de la resistencia o sensibilidad de distintas especies a este antibiótico es un punto clave a tratar (Luque *et al.*, 2011).

En 2016, se describió en cepas de *E. coli* de animales en China, un mecanismo nuevo de resistencia a colistina, de carácter plasmídico y por tanto transferible a otras

bacterias, asociado a la expresión del gen *mcr-1* (Liu et al., 2016). Estudios posteriores han permitido detectar cepas con este mecanismo de resistencia en otros lugares geográficos, incluyendo el Norte de África (Maamar et al., 2018). Recientemente se han descrito variantes minoritarias del gen *mcr* (*mcr-2*, 3, 4 y 5) en algunos aislados de *E. coli* (García et al., 2018).

3.3. Uso clínico y no clínico de los antibióticos

Muchos trabajos demuestran que el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos es debido a su elevado uso y abuso. Estos compuestos se utilizan tanto en medicina como en veterinaria con dos finalidades: terapéutica y profiláctica (para prevenir el desarrollo de enfermedades infecciosas).

Durante mucho tiempo también se han usado los antibióticos como promotores del crecimiento de animales, aunque actualmente este uso está prohibido en la Unión Europea. (Torres, 2007).

En el caso de los β -lactámicos, son unos de los principales antibióticos en el ámbito hospitalario. Pero el problema no radica en la utilización en hospitales, si no en el abuso que la comunidad realiza de estos antibióticos sin previo conocimiento ni orientación médica.

En el caso de animales, y centrándonos en el ganado porcino, estos antibióticos se emplean principalmente para el tratamiento de enfermedades como la neumonía, poliartritis, etc.

Curiosamente mucho de los antibióticos usados en el ámbito animal, tienen mucha importancia en medicina humana, por lo que la resistencia a éstos no solo viene dada por el uso humano, sino por la utilización en ganadería. De esta forma los animales se convierten en un medio de propagación de bacterias resistentes a antibióticos, con distintos vehículos de propagación como: la carne, las heces, el aire, etc. (Torres and Zarazaga, 2007).

3.4. *Escherichia coli*

La especie *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, fermentador de la lactosa, oxidasa negativa, indol positivo y citrato negativo. Esta bacteria se puede encontrar en diversos nichos ecológicos, desde agua, suelo hasta en los aparatos digestivos de animales y humanos.

E. coli es capaz de coexistir con otras especies de bacterias, por lo que es capaz de desarrollar distintas estrategias para su supervivencia.(Alonso *et al.*, 2017a).

3.5. Mecanismos de resistencia a los β -lactámicos

Debido a su gran uso, las bacterias han creado distintos mecanismos de acción frente a este tipo de antibióticos. Principalmente se encuentran tres:

- a) Mutaciones en las proteínas de unión a penicilina (PBP).
- b) Permeabilidad reducida en la membrana celular
- c) Producción de enzimas de hidrólisis de β -lactamasas.

De los tres anteriores, el más común en bacterias Gran negativas es la producción de enzimas de hidrólisis de β -lactamasas. Estas enzimas son capaces de romper el anillo β -lactámico evitando su actuación (*Figura 1*). (Suárez and Gudiol, 2009).

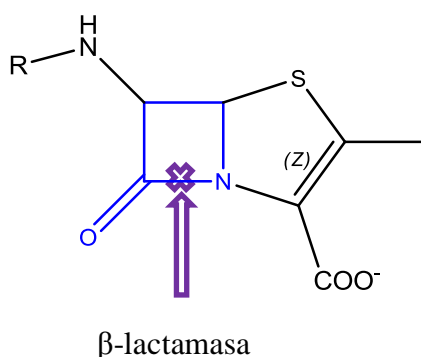


Figura 1. Mecanismo de acción de β -lactamasas.

Este tipo de enzimas se pueden clasificar en cuatro grupos distintos según su estructura: A,B,C (serin- β -lactamasas) y D (metalo- β -lactamasas, dependientes de Zn^{+2}); según su función están los grupos 1,2,3,4. De ellos el más habitual en Gram Negativas es el A y dentro de este grupo las β -lactamasas de espectro extendido las cuales son inhibidas por la acción de amoxicilina-ácido clavulánico.

3.5.1. β -lactamasas de espectro extendido

Las β -lactamasas de espectro extendido o BLEEs, deben su aparición a la evolución de las β -lactamasas de espectro reducido generada por distintas mutaciones en los genes que las codifican o a la movilización de estos genes en diferentes estructuras genéticas. Las enterobacterias que son capaces de producir este tipo de

enzimas son resistentes a los antibióticos β -lactámicos como penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no a cefamicinas (cefotixina) ni a carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem). También hay que mencionar que la acción de las BLEE es reducida por los inhibidores de β -lactamasas, el más conocido es el ácido clavulánico. Gracias a esta propiedad somos capaces de detectar la existencia de este tipo de enzimas. Los genes que las codifican se encuentran en elementos móviles que facilitan su diseminación y con frecuencia presentan coexistencia a otros antibacterianos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas (Calvo *et al.* 2011).

Las BLEE se pueden clasificar con tres criterios distintos: según sus características estructurales (Ambler 1980) se distinguen los grupos A, B, C, y D; un segundo criterio basado en el sustrato y su actuación (Brush and Jacoby, 2010), distinguiéndose tres grupos: 1,2,3; y finalmente desde el criterio clínico (Giske, 2009) (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación principal de BLEEs (Drawz and Bonomo, 2010)

Clasificación molecular	Clasificación funcional	β -lactamasas representativas
A (serin penicilinasas)	2a	PC 1
	2b	TEM-1,TEM-2,SHV-1
	2be (β -lactamasas de amplio espectro)	SHV-2 a SHV-6,TEM-3 a TEM-26, CTX-Ms
	2br	TEM-30,SHV-10,SHV-72
	2c	PSE-1,PSE-3,PSE-4,CARB-3
	2e	CepA,FEC-1
	2f	KPC-2,IMI-1,SME-1
B (metalo- β -lactamasas)	3a	IMP-1,VIM-1,Cer-A,IND-1,etc
	3b	CphA,Sfh-1
C (cefalosporinas)	1	AmpC, ACT-1, etc
	1e	GC1,CMY-37
D (oxacilinasas)	2d	OXA-1 a OXA-10
	2de	OXA-11 a OXA-15
	2df	OXA-23 a OXA-48

Las betalactamas de espectro extendido en *E. coli* están generalmente incluidas en el grupo A según Ambler y 2be siguiendo la clasificación de Brush y Jacoby, los cuales contienen a las familias más importantes de este tipo de enzimas, TEM, SHV y CXT-M (Calvo.*et al.*, 2011). Este grupo es el que se estudiará en este trabajo.

Las primeras BLEE se describieron en Alemania en 1983 en diferentes aislados de enterobacterias que presentaban un fenotipo anormal que incluía resistencia a cefotaxima y ceftazidima, que podía transferirse por conjugación. En ellas se reconoció una variante de la β -lactamasa SHV-1, a la que se denominó SHV-2 por presentar una mutación en la secuencia aminoacídica, que ampliaba el espectro hidrolítico de la anterior. En 1984 se aislaron en Francia cepas de *Klebsiella pneumoniae* con un fenotipo similar debido a una variante de la β -lactamasa TEM-2, denominada inicialmente CTX-1, y posteriormente TEM-3, que incluía 2 mutaciones en su secuencia y, al igual que SHV-2, podía transferirse por conjugación. (Valverde *et al.*, 2004)

3.5.1.1. BLEEs de la clase CTX-M

La evolución temporal de este tipo de enzimas ha provocado que las BLEE más prevalentes en estos momentos sean las de la familia CTX-M. En 1989, casi simultáneamente en Alemania y Argentina, y muy próximo en el tiempo en Francia, se aíslan enterobacterias con idéntico fenotipo. Las β -lactamasas responsables se denominaron genéricamente CTX-M y se comprobó que no tenían relación alguna con las BLEE descritas hasta la fecha. En la actualidad se han descrito más de 100 β -lactamasas de tipo CTX-M agrupadas en torno a seis enzimas diferentes según su secuencia de aminoácidos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25, Kluc). A su vez cada grupo incluye un número de variantes que difieren por una o pocas sustituciones de aminoácidos (*Figura 2*) (D'Andreaa *et al.*, 2013). En la actualidad, este tipo de BLEEs es muy frecuente en *E. coli*.

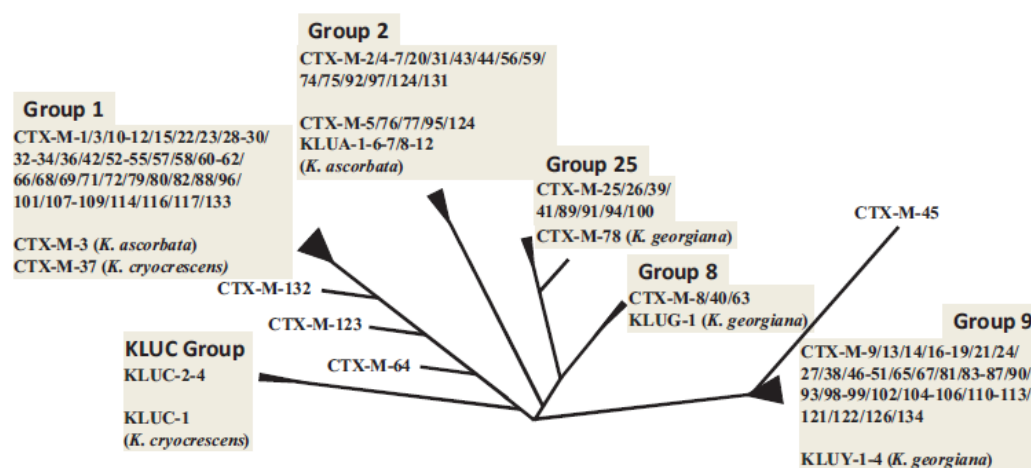


Figura 2. Grupos y familias de las enzimas CTX-M

Las β -lactamasas de tipo CTX-M derivan su nombre por la potente actividad frente a la cefotaxima, que es un sello funcional de estas enzimas. Esta característica depende de un peculiar entorno y flexibilidad de la enzima lo cual permite un reconocimiento e hidrólisis muy eficientes de este tipo de antibióticos.

En España, la primera publicación en la que se nombran estas enzimas, en concreto CTX-M-9, pertenece al Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (proyecto GEIH-BLEE 2000) que detectaron esta enzima en cepas de *E. coli* y *Salmonella* en Barcelona en el periodo comprendido entre los años 1996 y 2000. (Sabaté *et al.*, 2002).

La elevada presencia de aislados con CTX-M-9 en España ha sido corroborada en varios estudios locales, tanto en pacientes hospitalizados como no hospitalizados, así como en estudios realizados en animales o en muestras alimentarias y agrícolas donde se detectan distintas variantes de CTX-M (Alcala *et al.*, 2016; Alonso *et al.*, 2017b; Ben Sallem *et al.*, 2012; Ben Said *et al.*, 2015). Una situación análoga sucede con los aislados que albergan el gen CTX-M-14, perteneciente al mismo grupo de CTX-M-9. También se ha detectado en *Salmonella* y en cepas de *E. coli* en muestras fecales de humanos (Riaño *et al.*, 2009). Como en otros países de nuestro entorno, en los últimos años se ha producido una explosión en la variedad de enzimas detectadas en España, superior al de las BLEEs de las familias TEM y SHV detectadas con anterioridad y han aparecido nuevas enzimas en particular del grupo CTX-M-1 (CTX-M-1, -3, -15, -28 y -32). Muchas de estas enzimas tienen la particularidad de conferir un mayor grado de resistencia a ceftazidima que las de otros grupos de CTX-M y tienen una importancia epidemiológica creciente, aunque en menor medida que la publicada en otros países de nuestro entorno (Bevan *et al.*, 2017).

4. OBJETIVOS

- 1- Re-identificación mediante espectrometría de masas de una colección de Enterobacterias previamente aisladas a partir de aire y lodos de dos granjas porcinas.
- 2- Estudiar los fenotipos de resistencia de dichas bacterias frente a antibióticos de diferentes familias.
- 3- Detectar fenotípicamente la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs)
- 4- Caracterizar por PCR y secuenciación los genes codificantes de BLEEs en las cepas productoras de dichas enzimas.
- 5- Estudiar la sensibilidad a colistina en las cepas productoras de BLEEs, así como la presencia del gen *mcr-1* en las cepas resistentes a dicho antibiótico.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Cepas de *E. coli* incluidas en el estudio

Se analizaron 38 aislados de *E. coli* procedentes de aire y lodos de dos granjas porcinas de La Rioja, una de crecimiento intensivo, y la otra semi-extensivo. Los aislados se obtuvieron durante el período de septiembre 2008 a abril 2010. Dichas cepas forman parte de un estudio previo (Sanz *et al.*, en revisión), enfocado a conocer los microorganismos presentes en el aire de granjas porcinas, en el cual se obtuvieron las 38 cepas incluidas en este trabajo fin de grado, para su caracterización fenotípica y genotípica.

5.2. Identificación de las cepas por MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF es ampliamente utilizada para la detección de biomoléculas como péptidos y proteínas, sin ruptura durante el proceso.

Esta técnica se basa en una ionización MALDI y un analizador de tiempo de vuelo. La ionización MALDI consiste en una cocrystalización entre la muestra y una matriz, cuando el disolvente se evapora, sobre una placa de metal. Esta preparación es sometida a pulsos cortos de laser en vacío, de tal manera que la matriz absorbe la energía y es capaz de producir protones, los cuales son transferidos a la muestra dando lugar a especies monocargadas. Estos iones pasan por calentamiento a fase gas. Posteriormente pasan al analizador tiempo de vuelo (TOF) y finalmente al detector, el cual produce distintas señales según la relación carga/masa de las proteínas, que son comparadas con la base de datos BioTyper (Bruker), siendo así capaces de determinar de qué especie de bacteria se trata (Spengler *et al.*, 1991).

En primer lugar, se debe colocar la bacteria en los pocillos que contiene la placa de metal; este paso se realiza a partir de una colonia aislada. A continuación, se coloca sobre la muestra un microlitro de ácido fórmico, después de dejarlo secar, se añade un microlitro de matriz maldi (Bucker HCCA 2.5 mg) y el calibrante (Bucker Bacteria Test Estándar). El calibrante es un compuesto usado como medida de referencia para el espectrómetro, el cual proporciona un perfil proteico de una cepa de *E. coli* standard. En este estudio, la identificación por MALDI-TOF se realizó con el espectrofotómetro de masas Biotyper CA System microflex LT/SH.

5.3. Cepas de referencia

Para la realización de las PCRs se usaron controles positivos de la colección de cepas de la Universidad de La Rioja según la siguiente tabla.




Tabla 3. Número de identificación de las cepas de la Universidad de la Rioja utilizadas como referencia y los distintos genes que contenían.

N.º de identificación de las cepas	Control positivo para el gen
C999	<i>bla</i> _{CTX-M-3}
C1535	<i>bla</i> _{SHV 12}
C1452	<i>bla</i> _{CTX-M-9}
C6944	<i>mcr-1</i>
C3981	<i>bla</i> _{TEM}
C999	<i>chuA</i>
C7397	<i>yjaA</i>
C7397	<i>TSPE4.C2</i>

5.4. Medios de cultivo empleados

A lo largo de este trabajo se han usado diferentes medios de cultivo para el crecimiento o conservación de los microorganismos.

Medios utilizados:

-  **Brain Heart Infusion (BHI)** : empleado para el crecimiento de *E. coli*.
-  **Müller-Hinton agar(agar MH)**: El cual se utilizó para los estudios de sensibilidad a antibióticos, es decir para la realización de los antibiogramas.
-  **Leche descremada deshidratada**: La cual se utilizó para la conservación de las cepas congeladas, después de ser analizadas.

5.5. Determinación de la sensibilidad a antibióticos

Unos de los objetivos fue estudiar la resistencia de *E. coli* hacia distintos antibióticos.

5.5.1. Antibióticos estudiados.

Se determinó la sensibilidad de los siguientes antibióticos: ampicilina (AMP), amoxicilina-clavulánico (AMC), ceftazidima (FOX), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), tetraciclina (TET), cloranfenicol (CHL), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), estreptomicina (STR) y colistina (COL). Los métodos empleados para la determinación de la sensibilidad se detallan a continuación.

5.5.2. Difusión en agar. Antibiograma

Se estudió la sensibilidad a diferentes antibióticos en todas las cepas mediante el método de difusión en agar, también conocido como antibiograma, siguiendo las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018).

Antes de iniciar la técnica, se sembraron las cepas en medio sólido BHI, con re-aislamiento, para obtener colonias aisladas tras incubación a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se realizó el cultivo en agar BHI de una colonia aislada del microorganismo y se incubó de nuevo en 37°C durante 24h, para tener el cultivo preparado para iniciar la técnica del antibiograma.

A continuación, se preparó una suspensión bacteriana con una concentración 0,5 McFarland en solución salina 0.9 % (equivalente aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonia/ml), y posteriormente se sembró en forma de césped, con ayuda de una torunda estéril, sobre placas de MH agar.

Una vez sembrada la bacteria, se colocaron los discos de antibióticos con las concentraciones adecuadas (6 discos por placa) de tal manera que éstos se encontraban a una separación de 2 cm. A continuación, las placas se incubaron a 37°C durante 24h. Tras este tiempo, se midió el halo de inhibición producido y con los valores recomendados por CLSI se pudo determinar la resistencia o sensibilidad de nuestras cepas a los antibióticos utilizados en este estudio.



Figura 3. Esquema con los distintos pasos a dar hasta conseguir el antibiograma

Tabla 4. Carga de antibiótico de los discos y diámetro de los puntos de corte recomendados por el CLSI (2018)^a de diferentes antibióticos para *E. coli*.

Antibiótico	Carga por disco(μ g)	Punto de corte (en mm)		
		S	I	R
Ampicilina(AMP)	10	≥ 17	14-16	≤ 13
Amoxicilina-clavulánico (AMC)	30	≥ 18	14-17	≤ 13
Cefoxitina(FOX)	30	≥ 18	15-17	≤ 14
Ceftazidima(CAZ)	30	≥ 21	18-20	≤ 17
Cefotaxima(CTX)	30	≥ 26	23-25	≤ 22
Tetraciclina (TET)	30	≥ 15	12 -14	≤ 11
Cloranfenicol (CHL)	30	≥ 18	13-17	≤ 12
Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	25	≥ 16	11 -15	≤ 10
Gentamicina (GEN)	10	≥ 15	13 -14	≤ 12
Ciprofloxacina (CIP)	5	≥ 31	21- 30	≤ 20
Estreptomicina (STR)	10	≥ 15	12 -14	≤ 11

R:resistente; S:sensible; I:intermedio

5.5.3. Determinación fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Test de doble disco

La producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se determinó mediante la técnica de doble disco. Debido a la capacidad que los inhibidores de β -lactamasas (como el ácido clavulánico) tienen sobre las BLEES, las cepas *E. coli* productoras de este tipo de enzimas pueden ser identificadas fenotípicamente mediante dicho test de doble disco que pone de manifiesto dicha actividad inhibitoria.

La técnica del doble disco consiste en realizar un antibiograma con tres tipos de antibióticos concretos, colocados en una secuencia determinada. Para poder ver la existencia o no de esta enzima se debe de colocar el disco de un antibiótico de combinación β -lactámico-inhibidor, enfrentado a dos discos de antibióticos de cefalosporinas de amplio espectro. En este caso se coloca amoxicilina-ácido clavulánico (AMC, 30 μ g) rodeado de ceftazidima (CAZ, 30 μ g) y de cefotaxima (CTX, 30 μ g).

El AMC incluye el inhibidor de β -lactamasas y la deformación del halo (ensanchamiento) en las proximidades de este disco nos da idea de la presencia de una posible cepa productora de una BLEE (*Figura 4*).

De esta forma se puede obtener una estimación sobre si la cepa es productora o no, fenotípicamente, pero para estar completamente seguros es necesario una confirmación genotípica, determinando la presencia del gen correspondiente por la técnica de PCR-secuenciación.

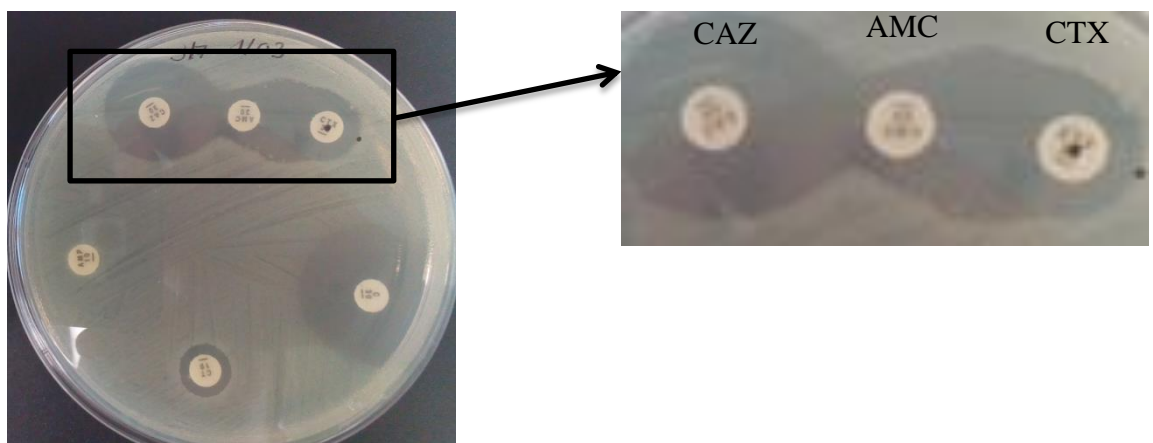


Figura 4. Ejemplo representativo de *E. coli* productora de BLEE, en el que se observa la deformación del halo de inhibición en la proximidad del inhibidor de beta-lactamasas.

5.5.4. Estudio de la sensibilidad a colistina mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

El estudio de la resistencia o sensibilidad de *E. coli* al antibiótico colistina, es un tema de gran importancia debido a la emergencia en los últimos años de este tipo de resistencia en el ámbito ganadero y su repercusión clínica. El estudio de la sensibilidad a colistina mediante antibiograma debe ser siempre corroborado mediante la determinación de la CMI.

Se conoce como CMI a la concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de una población estándar microbiana. El análisis de la CMI a colistina para las cepas del estudio fue realizado en el laboratorio de Microbiología del Hospital San Pedro, gracias a la colaboración con el Dr. J. M Azcona, Facultativo de Microbiología de dicho hospital. Se facilitaron los datos de CMI a la UR y posteriormente se determinó la resistencia o sensibilidad por comparación con los puntos de corte establecidos por el CLSI (2018): valores de CMI ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ están en el rango de resistencia y valores ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ en el rango de sensibilidad.

5.6. Extracción del DNA

Para la realización de la PCR se utilizó una técnica rápida de extracción de ADN. Este método, denominado método hervido, se basa en la ruptura de la pared celular a través de un proceso físico, como es la ebullición. De manera que permite la salida del contenido celular, el cual queda en suspensión.

La manera de proceder fue la siguiente: se tomó con un asa de siembra una colonia aislada de un cultivo fresco y puro de la bacteria, sembrado en placas de BHI-agar durante 24h. Una vez obtenida la colonia se suspendió en 500 μL de agua destilada estéril colocada en un eppendorf. Esta suspensión se agitó por vortex y se hirvió durante 8 min, a una temperatura de 100° C. Posteriormente se agitó de nuevo y se centrifugó 3 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante obtenido, donde se encontraba el DNA deseado, se trasvasó a un eppendorf estéril y se almacenó a 4°C.

Tras la extracción, se realizó una medida de absorbancia de los ácidos nucleicos a 260 y 280 nm, con ayuda de un espectrofotómetro (Nanodrop). Gracias a esta medida se puede obtener la concentración de DNA (260 nm) y su pureza (relación 260/280). Para confirmar una buena extracción los valores de concentración deben de estar entre 400-600 ng, y el cociente entre absorbancias entre 1,80 y 1,90.

5.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) es una técnica de biología molecular descrita por Kary Mullis cuyo objetivo es amplificar un fragmento de DNA concreto delimitado por un par de cebadores. Actualmente esta técnica es muy utilizada por su sencillez para la detección rápida y específica de genes. La PCR se basa en la síntesis de DNA a través de la enzima Taq polimerasa con ayuda de dos cebadores de polaridad opuesta y de secuencia complementaria a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA de doble cadena que queremos amplificar.

Para llevar a cabo la amplificación, este método se basa en tres reacciones sucesivas que tienen lugar a diferente temperatura:

1. Desnaturalización: las dos hebras de DNA se separan, rompiendo las interacciones que las mantienen unidas.
2. Hibridación: Los cebadores se unen a los extremos 3' de la cadena de DNA que delimitan el fragmento a amplificar.
3. Elongación: se produce la síntesis de la cadena por la acción de la Taq polimerasa uniendo los distintos nucleótidos.

Estos tres pasos se repiten un número determinado de veces con el fin de conseguir millones de copias de la secuencia original.

Para llevar a cabo la técnica de PCR se utilizaron los siguientes termocicladores: T3 y T3000 Thermocycler (Biometra)

Para poder llevar a cabo la amplificación de DNA, se crea en primer lugar una mezcla de los componentes necesarios para poder producir esa ampliación del DNA, los cuales son: un Buffer de NH_4 , MgCl_2 , nucleótidos (dNTP), agua miliQ, Bio-Taq DNA polimerasa, cebador directo y cebador reverso, cada uno de estos compuestos deben de estar en una concentración determinada en cada tubo a amplificar (*Tabla 5*).

Esta mezcla se realiza con los volúmenes totales de cada componente según el número de cepas a estudiar (cepas de estudios + controles). Una vez realizada la mezcla en un eppendorf, se añade un volumen concreto (40 μl) de esta mezcla en eppendorfs individuales y de menor volumen, tantos como muestras de cepas se tenga. Una vez se obtenga estos, se añade una cantidad exacta de DNA (10 μl) correspondiente a una cepa de estudio en cada uno de ellos (un eppendorf por cepa) (*Tabla 6*).

Tabla 5. Reactivos utilizados en la técnica de PCR

Componentes (distribuidor)	Concentración Stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
^a Cebador directo (<i>forward</i>)	25 µM	1 µl	0.5 µM
^a Cebador reverso (<i>reverse</i>)	25 µM	1 µl	0.5 µM
Tampón de reacción NH ₄ (Bioline)	10X	5 µl	1X
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	1.5 µl	1.5 mM
dNTP (Sigma Aldrich)	2.5 mM	1 µl	0.05 mM
BioTaq DNA polimerasa (Bioline)	5U/ µl	0.3 µl	0,003U
Agua miliQ estéril	-	30.2 µl	-
DNA	-	10 µl	-

^a Los cebadores fueron sintetizados por Sigma Aldrich en una concentración 100µM. A partir de éstos, preparamos nuestro stock de trabajo a 25µM: 25µl cebador + 75µl H₂O

Tabla 6. Ejemplo de volúmenes añadidos para un número total de 3 cepas y 2 controles.

Componentes	Volumen en tubo de mezcla
^a Cebador <i>directo</i> (<i>forward</i>)	5 µl
^a Cebador <i>reverso</i> (<i>reverse</i>)	5 µl
Tampón de reacción NH ₄	25 µl
MgCl ₂	7,5 µl
dNTP	5 µl
BioTaq DNA polimerasa (Bioline)	1,5 µl
Agua miliQ estéril	151 µl
Volumen cada tubo individual	40µl mezcla + 10 µl DNA

En todas las reacciones se necesitan dos controles, uno positivo y uno negativo. El control positivo, contiene la mezcla de los componentes principales y DNA de una cepa, de la cual se tenga la certeza que tiene el gen que se quiere estudiar. Con él vamos a corroborar si nuestras cepas de estudio lo contienen o no. El control negativo únicamente tiene los compuestos comunes que se encuentran en esa mezcla creada, pero sin DNA añadido, este control se utiliza para corroborar que la mezcla usada no está contaminada con DNA externo y así se tiene la certeza de que solo amplifica el DNA a estudiar.

Las secuencias de los cebadores, las condiciones de amplificación y los tamaños de los fragmentos de DNA amplificados en cada caso se describen en la siguiente tabla (Tabla 7).

Además del uso de la PCR para la detección de los distintos genes de resistencia a antibióticos, también se utilizó para determinar el grupo filogenético de las distintas cepas. El procedimiento fue el mismo que se ha descrito con anterioridad lo único que los cebadores utilizados fueron distintos.

Tabla 7. Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados para la PCR y sus condiciones de amplificación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación			Referencia (tamaño del amplicón)
<i>bla</i> _{SHV}	96°C	5 min	1 ciclo	Pitout <i>et al.</i> 1998 (885 pb)
F: CACTCAAGGATGTATTGTG	96°C	15 s	24 ciclos	
R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	52°C	15 s		
	72°C	2 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
	94°C	3 min.	1 ciclo	
<i>bla</i> _{CTX-M9} (Grupo 9)	94°C	45 seg.	35 ciclos	Coque <i>et al.</i> , 2002 (857 pb)
GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	62°C	45 seg.		
	72°C	45 seg.		
ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	72°C	10 min.	1 ciclo	

<i>bla</i> _{CTX-M-3G} (Grupo 1)	94°C	7 min.	1 ciclo	
GTTACAATGTGTGAGAAGCAG	94°C	50 seg.		
	50°C	40 seg.	35 ciclos	Pagani <i>et al.</i> , 2003
CCGTTTCCGCTATTACAAAC	68°C	1 min.		(1017 pb)
	68°C	5 min.	1 ciclo	
<i>bla</i> _{CTX-M-UNIVERSAL}	94°C	5 min.	1 ciclo	
CGATGTGCAGTACCAGTAA	94°C	30 seg.		Batchelor <i>et al.</i> ,
	60°C	30 seg.	35 ciclos	2005
TTAGTGACCAGAATCAGCGG	72°C	1 min.		(585 pb)
	72°C	5 min.	1 ciclo	
<i>chuaA</i>				Clermont <i>et al.</i> , 2000
GACGAACCAACGGTCAGGAT				
	94°C	5 min	1 ciclo	
TGCCGCCAGTACCAAAGACA				(279 pb)
<i>yjaA</i>	94°C	30 seg.		
	55°C	30 seg.	30ciclos	
TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	72°C	30 seg.		(211 pb)
ATGGAGAATGCGTTCCTCAA	72°C	7 min.	1 ciclo	
<i>tspE4C2</i>				
GAGTAATGTCGGGGCATTCA				(152 pb)
CGCGCCAACAAAGTATTACG				
<i>mrc-1</i>	95°C	3 min	1ciclo	
CGGTCAGTCCGTTTGTTC	95°C	30s		Zou <i>et al.</i> , 2017
	55°C	30s	30ciclos	
CTTGGTCGGTCTGTAGGG	72°C	30s		
	72°C	5 min	1 ciclo	

5.8. Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los fragmentos amplificados por PCR se utilizó la electroforesis horizontal en gel de agarosa, que nos permite separar fragmentos de DNA de distinto tamaño, gracias a la acción de un campo eléctrico.

Para la preparación del gel se utilizó una concentración de agarosa (Agarose D1 low EEO, Pronadisa) en un rango entre 1% y 2% (m/v) en tampón TBE 1X. Este buffer se preparó a partir de un stock concentrado TBE 5X compuesto por: 54 g/l tris(hidroximetil) aminometano; 27,5 g/l ácido bórico; 20 ml EDTA 0,5 M pH=8.

Una vez preparada la mezcla, se calentó hasta su total disolución. Para poder visualizar los fragmentos de DNA, se añadió a la mezcla 6 µl de Mirodi Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH), el cual es un intercalante que permite la visualización del DNA al ser irradiado por luz UV. Todo ello se vertió en un molde al que hemos colocado un peine para la formación de los pocillos correspondientes para poder cargar después las muestras.

Se dejó solidificar dentro de la campana y, a continuación, se cargó cada uno de los pocillos con 10 µl del producto de PCR mezclados con 2 µl de tampón de carga [(10% (m/v) sacarosa; 0,0025% (m/v) azul de bromofenol; 0,0025% (m/v) xileno cianol].

Posteriormente el gel cargado se sumergió en una cubeta de electroforesis llena de tampón TBE 1X y sometido a un campo eléctrico de 96 V durante 45 min.

Por último, el gel se visualizó en un transiluminador ultravioleta y se fotografió con un captador de imágenes (Image Store 5000, UVP) gracias al programa informático ChemiGenius (GenSnap from SynGene).

5.9. Secuenciación

Se ha empleado la técnica de secuenciación para la caracterización de los genes de resistencia que se observaron mediante la PCR. Esta técnica se basa en obtener las secuencias de nucleótidos que caracterizan a cada uno de los genes aislado y estudiados. Como cebadores de secuenciación se emplearon los mismos que fueron utilizados en la PCR.

La secuenciación se llevó a cabo según el método de secuenciación Sanger. La empresa encargada fue Cogenics (United Kingdom), la cual utiliza un sistema automático ABI Prism 3730 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Para el análisis de las secuencias se utilizaron los siguientes programas:

- ✚ BLAST, Basic Local Alignment Search Tool para comparar la secuencia de interés con las depositadas en GeneBank, base de datos del NCBI:
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- ✚ EMBOSS Needle, para alinear pares de secuencias tanto de DNA como de proteínas y verificar su similitud:
https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/
- ✚ EMBOSS Transeq, para convertir secuencias de DNA a proteína y viceversa.
https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/

5.10. Determinación del grupo filogenético

Para el estudio del grupo filogenético de las cepas *E. coli* se realizaron distintas PCR con tres genes concretos: *chuaA*, *yjaA*, y *TSPE 4.C2*, siguiendo el esquema descrito por Clermont *et al.*, 2011.

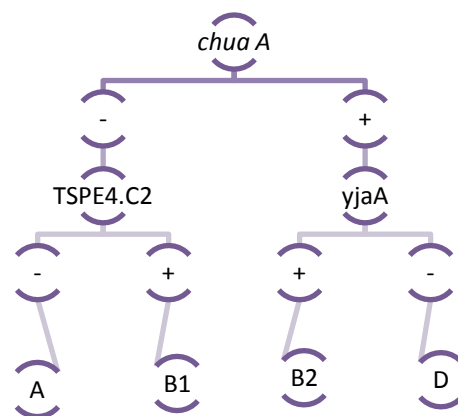


Figura 5. Esquema del procedimiento a seguir para determinar el grupo filogenético

Según el esquema mostrado (Figura 5), el primer paso fue realizar la PCR con el gen *chuaA*, y su presencia o no en las distintas cepas, determinó qué camino seguir, es decir, cuál sería el segundo gen a testar y finalmente el grupo filogenético al que las cepas pertenecían. Se incluyeron controles positivos de los diferentes grupos filogenéticos.

6. RESULTADOS

6.1. Identificación de las cepas

Se analizaron las 38 cepas de Enterobacterias procedentes de dos granjas porcinas distintas, todas ellas fueron re-identificadas mediante MALDI-TOF con el software Biotyper como especie *E. coli*, por lo cual fueron utilizadas en este trabajo.

6.2. Determinación de la sensibilidad a antibióticos

6.2.1. Método de difusión en agar (antibiograma)

Se estudió la sensibilidad a diferentes antibióticos por el método de difusión en agar en los 38 aislados de *E. coli*. En la *Figura 6* se observa un ejemplo representativo de uno de los antibiogramas obtenidos con una de las cepas del estudio. En la *Tabla 8* se muestran los resultados de los halos de inhibición (en mm) y en la *Figura 7* los porcentajes de resistencia/sensibilidad para cada antibiótico en las cepas estudiadas. En la *Tabla 9* se pueden observar los fenotipos de resistencia obtenidos por cada cepa.

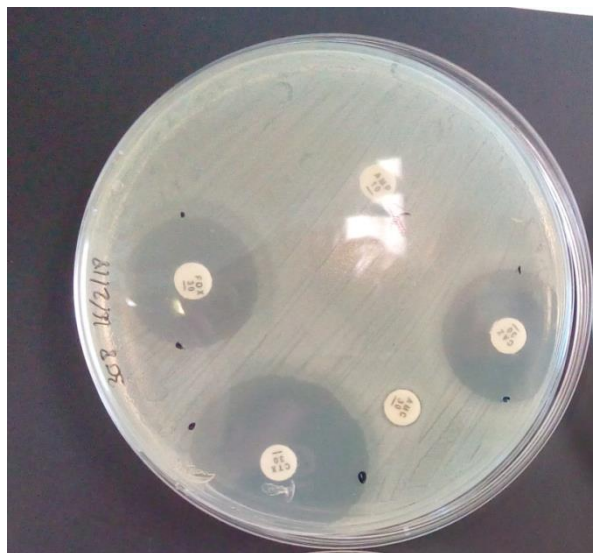


Figura 6. Ejemplo de antibiograma con una de las cepas *E. coli* donde se observan los halos de inhibición producidos para cada antibiótico testado

Tabla 8. Valores de diámetro de los halos de inhibición para cada antibiótico y cepa estudiada

Cepas	Cepas UR	Ampicilina	Amoxicilina a.clavulánico	Cefoxitina	Ceftazidima	Cefotaxima	Tetraciclina	Cloranfenicol	SXT	Gentamicina	Ciprofloxacina	Estreptomicina
308	C10516	<6	10	20	22	30	<6	29	18	12	34	10
309	C10517	17	22	24	24	24	11	32	<6	16	44	15
310	C10521	<6	16	19	26	32	<6	10	<6	15	36	11
311	C10518	<6	10	11	24	30	<6	22	<6	11	24	10
312	C10519	<6	<6	24	22	30	<6	29	<6	16	20	9
313	C10520	<6	10	24	22	30	<6	24	<6	18	32	12
315	C10522	<6	14	18	22	30	10	14	<6	14	32	17
316	C10523	<6	8	18	24	30	<6	30	30	14	32	10
317	C10524	<6	BLEE+	20	20	12	10	28	<6	10	10	10
318	C10525	<6	12	18	14	30	9	30	<6	15	34	19
320	C10527	<6	12	19	14	32	10	15	<6	15	34	15
E5	C10528	<6	20	20	28	36	8	14	<6	17	28	15
E7	C10529	<6	12	16	26	32	<6	30	<6	<6	24	15
E8	C10530	<6	10	20	30	36	<6	15	<6	16	27	15
E9	C10531	<6	15	24	20	30	<6	10	<6	14	10	<6
E10	C10532	25	28	23	22	30	25	29	30	15	32	15
E46	C10532	<6	BLEE +	30	20	13	<6	8	<6	17	28	12
E47	C10533	<6	BLEE +	26	22	15	<6	10	<6	17	34	12
E48	C10534	<6	BLEE +	24	20	12	<6	10	<6	18	30	13
E49	C10535	<6	BLEE +	24	20	14	<6	13	<6	16	26	15
E50	C10536	<6	BLEE +	26	20	14	<6	10	<6	15	30	12
E51	C10537	<6	BLEE +	30	20	14	<6	10	<6	11	34	14
E52	C10538	<6	BLEE +	20	20	16	9	12	<6	17	26	15
E53	C10539	<6	BLEE +	28	22	16	10	11	<6	17	16	15
E54	C10540	<6	BLEE +	25	10	16	13	10	<6	10	30	9
E55	C10541	<6	BLEE +	25	18	13	10	12	<6	15	17	10
E56	X60	<6	BLEE +	24	26	14	<6	10	<6	16	25	15

153	X58	18	No evaluable	25	30	34	<6	30	28	19	32	10
154	X57	24	No evaluable	26	26	34	<6	10	16	16	40	13
E64	X49	16	No evaluable	24	28	30	24	26	30	16	32	16
E65	X50	<6	No evaluable	30	13	34	<6	30	34	17	35	19
E66	X51	35	Sensible	26	42	42	28	30	30	17	35	15
E67	X52	24	Sensible	27	34	36	12	30	27	17	48	13
E68	X53	24	Sensible	26	30	36	27	26	<6	16	40	15
E69	X54	24	Sensible	26	32	36	<6	26	12	17	40	19
E70	X55	24	Sensible	24	30	34	10	27	21	15	35	13
E71	X56	24	Sensible	28	28	30	22	30	30	15	27	15
E72	X59	<6	Sensible	23	30	34	24	26	<6	15	35	<6

No evaluable : No se pudo determinar ya que los halos se cohesionaban demasiado con los de la CTX y CAZ

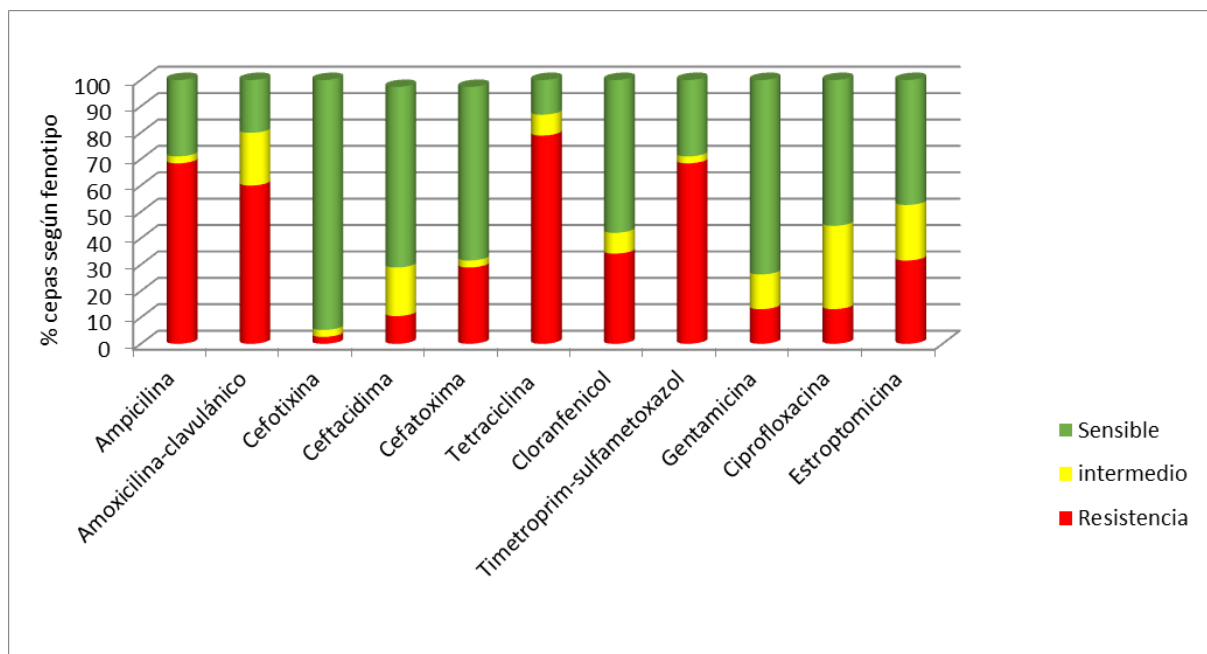


Figura 7. Porcentajes según los fenotipos detectados en los 38 aislados de *E. coli*.

Tabla 9. Fenotipos de resistencia a antibióticos de los 38 aislados de *E. coli*.

Cepas UR	Fenotipo R	Fenotipo MDR ^b
C10533	BLEE-TET-CHL-SXT	+
C10534	BLEE-TET- CHL -SXT	+
C10535	BLEE-TET-CHL-SXT	+
C10536	BLEE-TET- CHL -SXT-STR	+
C10537	BLEE-TET- CHL -SXT-GEN	+
C10538	BLEE-TET- CHL -SXT	+
C10539	BLEE-TET- CHL -SXT-CIP	+
C10540	BLEE- TET-CHL -SXT- GEN -STR	+
C10541	BLEE-TET- CHL -SXT-CIP-STR	+
X60	BLEE-TET- CHL -SXT	+
X58	TET-STR	-
X57	TET- CHL	-
X49	Sensible ^a	-
X50	AMP-CAZ-TET	-
X51	Sensible	-
X52	Sensible	-
X53	SXT	-
X54	TET	-
X55	TET	-
X56	Sensible	-
X59	AMP-SXT-STR	+
C10516	AMP-AMC-TET- GEN -STR	+
C10517	TET-SXT	-
C10521	AMP-TET-CHL-SXT-STR	+
C10518	AMP-AMC-FOX-TET-SXT-STR	+
C10519	AMP-AMC-TET-SXT-CIP-STR	+

C10520	AMP-AMC-TE-SXT	+
C10522	AMP-TET-SXT	+
C10523	AMP-AMC-SXT-STR	+
C10524	BLEE - TET-CIP- GEN -STR	+
C10525	AMP-AMC-CAZ-TET-SXT	+
C10527	AMP-AMC-CAZ-TET-SXT	+
C10528	AMP-TET-SXT	+
C10529	AMP-AMC-TE-SXT- CN	+
C10530	AMP-AMC-TET-SXT	+
C10531	AMP-TET- CHL -SXT-CIP-STR	+
C10532	Sensible	-
C10532	BLEE-TET-SXT- CHL	+

^aSensible: la cepa es sensible a todos los antibióticos testados.

^b MDR: multiresistencia, implica resistencia al menos a antibióticos de 3 familias diferentes

Como se puede observar, 26 de las 38 cepas (68,5%) presentaron un fenotipo de multiresistencia (MDR), es decir, resistencia a antibióticos de al menos 3 familias diferentes. Por otro lado, 5 de las 38 cepas (13%) fueron sensibles a todos los antibióticos testados.

Es interesante destacar el alto porcentaje de cepas que presentaron resistencia a ampicilina (68,4%) o amoxicilina-ácido clavulánico (60 %). Así mismo, son destacables los niveles de resistencia a tetraciclina (78.9%) o a SXT (68.4%). Los niveles de resistencia detectados para el cloranfenicol, y la estreptomicina estuvieron en el rango del 30 %.

Doce de las 38 cepas de *E. coli* (31,6%) presentaron un fenotipo BLEE-positivo, indicativo de la producción de β -lactamasas de espectro-extendido. Dado el interés de estas cepas y la importancia de determinar su posible asociación con la resistencia al antibiótico colistina, se caracterizaron en profundidad dichas cepas BLEE-positivas y se testó la resistencia a colistina en dichas cepas.

6.3. Estudio de BLEES en las cepas aisladas

Como se ha comentado anteriormente, 12 de las cepas de *E. coli* analizadas presentaron un fenotipo BLEE mediante el test del doble disco y el objetivo fue la caracterización de las mismas. La Figura 8 muestra dos antibiogramas ilustrativos de cepas con fenotipo BLEE positivo o negativo.

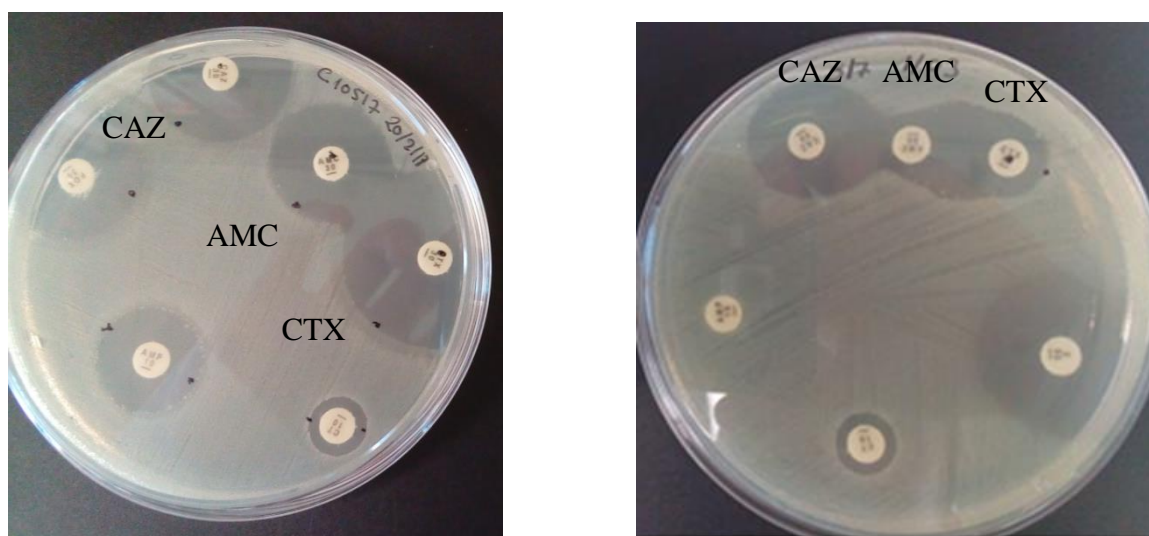


Figura 8. Ejemplo de antibiogramas de cepas *E. coli* con /sin fenotipo BLEE.

Imagen izquierda: cepa BLEE-negativa sin modificación del halo de inhibición;
Imagen derecha: cepa BLEE-positiva con ensanchamiento del halo de inhibición de cefotaxima en la proximidad al disco con ácido clavulánico.

En la *Tabla 10* se indican los fenotipos de resistencia de las 12 cepas BLEE positivas que serán objeto de estudio posterior.

Tabla 10. Características fenotípicas de las cepas BLEE positivas a estudiar

Cepa <i>E. coli</i> UR	Fenotipo de resistencia a antibióticos	Fenotipo BLEE
C10524	TET-CIP-GEN-STR	+
C10532	TET-CHL-SXT	+
C10533	TET- CHL -SXT	+
C10534	TET-CHL-SXT	+
C10535	TET- CHL -SXT	+
C10536	TET- CHL -SXT-STR	+
C10537	TET- CHL-SXT-GEN	+
C10538	TET- CHL -SXT	+
C10539	TET-CHL -SXT-CIP	+
C10540	TET- CHL -SXT-GEN-STR	+
C10541	TET- CHL -SXT	+
X60	TET-CHL-SXT	+

6.3.1. Estudio genotípico por la técnica de PCR

Una vez definidas las cepas a estudiar se comenzó la caracterización genotípica del tipo de β -lactamasas de espectro extendido. Para lo cual se estudió a partir de la técnica de PCR distintos genes:

- ✚ PCR universal para BLEEs del tipo CTX-M
 - En aquellas cepas portadoras de genes de tipo CTX-M, se estudió la presencia de genes pertenecientes a los grupos 1 y 9 dentro de CTX-M mediante PCRs específicas de dichos grupos.
- ✚ PCR para la detección de genes de tipo *bla_{SHV}*

Cuando se realizó la PCR con los cebadores universales de *bla_{CTX-M}*, las 12 cepas BLEE-positivas dieron un fragmento de DNA del tamaño esperado (585 pb), al igual que el control positivo (*Figura 9*). Esto es indicativo que todas las cepas portan un gen de este tipo de BLEE. El siguiente paso fue realizar las PCRs específicas de los diferentes grupos de *bla_{CTX-M}*, en concreto del grupo 1 y del grupo 9. Todas las cepas fueron positivas en la PCR específica de *bla_{CTX-M}* del grupo 9 (amplificación de un fragmento de 857 pb) y negativas en la PCR de *bla_{CTX-M}* del grupo 1 (ver *Figura 10*).

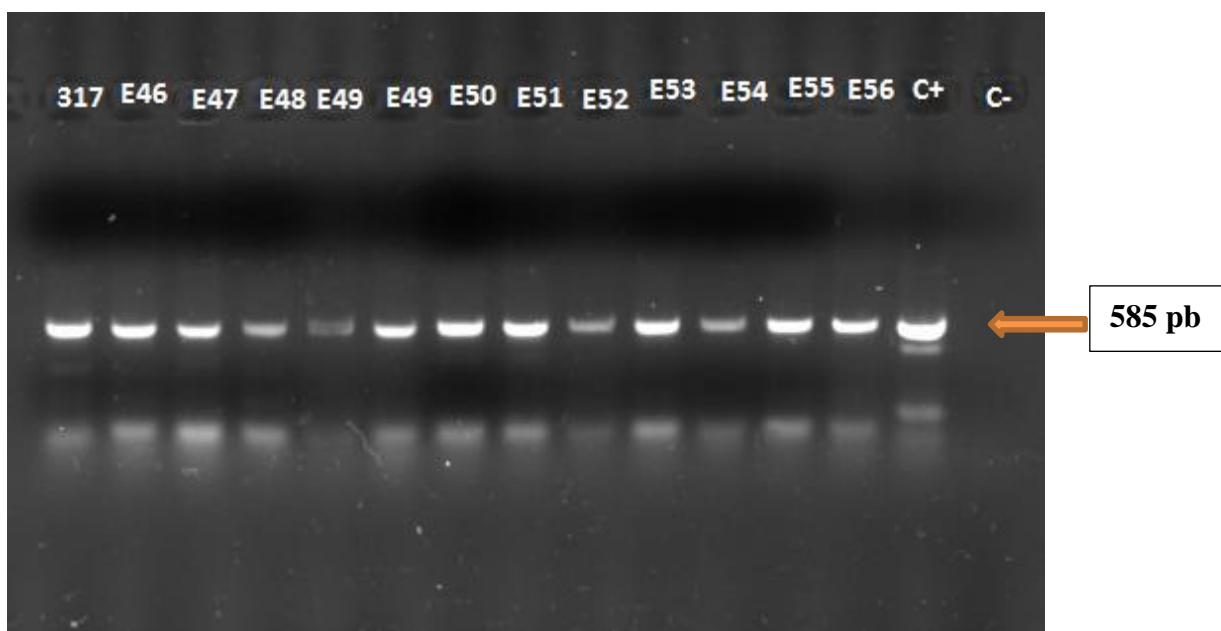


Figura 9. Resultados de la técnica de PCR para el gen *bla_{CTX-M}*- universal con las cepas BLEE positivas

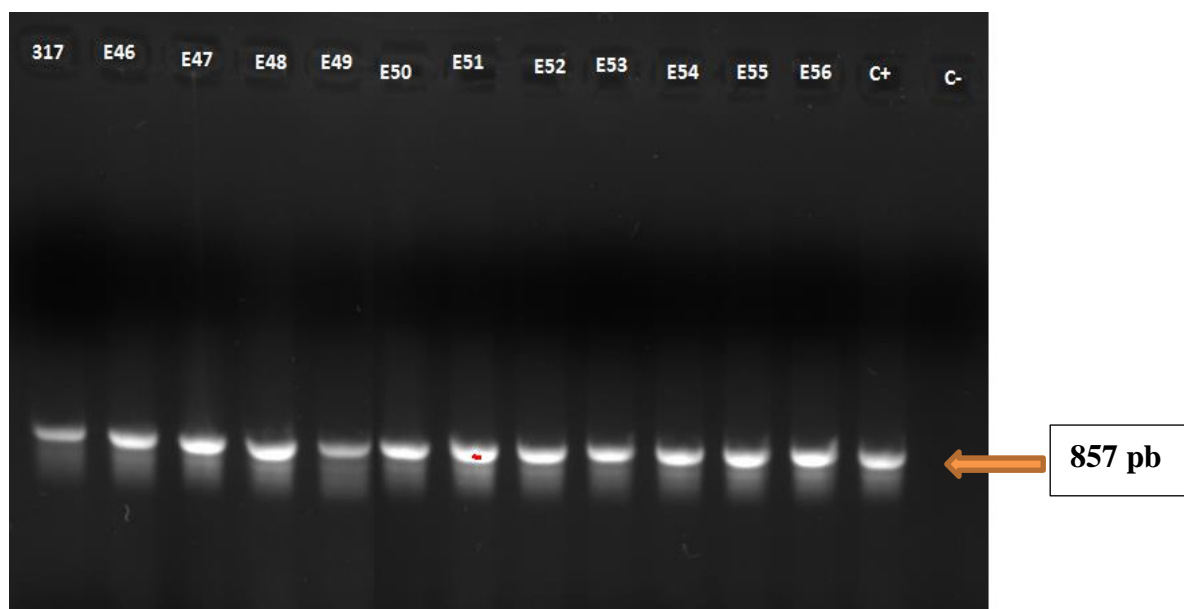


Figura 10. Resultados de la técnica de PCR para el gen *bla*_{CTX-M} del grupo 9 con las cepas BLEE positivas

6.3.2. Determinación de la variante del gen *bla*_{CTX-M} del grupo 9 por secuenciación.

Una vez detectado que las 12 cepas BLEE positivas poseían un gen *bla*_{CTX-M} del grupo 9, es necesario realizar la secuenciación del fragmento de DNA obtenido en la PCR para determinar la variante alélica del gen, por análisis de la secuencia nucleotídica y de su traducción en secuencia aminoacídica.

Para ellos se realizó la secuenciación de los productos de PCR de las 12 cepas, la cual fue llevada a cabo por un servicio externo a la Universidad como ya se ha indicado. Una vez recibidos los cromatogramas de las secuencias de cada una de las cepas, fueron verificados para ver su calidad y posteriormente se realizó el análisis de las secuencias usando diferentes herramientas bioinformáticas. Posteriormente, se produce la alineación de las distintas secuencias con la ayuda del programa (muscle clustal omega), con el cual se pueden comparar las secuencias entre sí. Finalmente, las secuencias son comparadas con las depositadas en las bases de datos del NCBI para determinar la variante alélica del gen.

En la figura siguiente se presentan las secuencias obtenidas para 4 cepas BLEE-positivas representativas. Se observa que todas ellas poseen la misma secuencia de nucleótidos.

Figura 11. Secuencia nucleotídica del producto de PCR de *bla*_{CTX-M} del grupo 9 de cuatro cepas BLEE-positivas representativas.

C10536-FW	GGCGGCGGCGTGCATTCCGCTG
C10524-FW	GGCGGCGGCGTGCATTCCGCTG
C10539-FW	GGCGGCGGCGTGCATTCCGCTG
C10537-FW	GGCGGCGGCGTGCATTCCGCTG

C10536-FW	CTGCTGGGCAGCGCGCCGCTTTATGCGCAGACGAGTGCGGTGCAGCAAAAGCTGGCGGCG
C10524-FW	CTGCTGGGCAGCGCGCCGCTTTATGCGCAGACGAGTGCGGTGCAGCAAAAGCTGGCGGCG
C10539-FW	CTGCTGGGCAGCGCGCCGCTTTATGCGCAGACGAGTGCGGTGCAGCAAAAGCTGGCGGCG
C10537-FW	CTGCTGGGCAGCGCGCCGCTTTATGCGCAGACGAGTGCGGTGCAGCAAAAGCTGGCGGCG

C10536-FW	CTGGAGAAAAGCAGCGGAGGGCGGCTGGGCGTCGCGCTCATCGATACCGCAGATAATACG
C10524-FW	CTGGAGAAAAGCAGCGGAGGGCGGCTGGGCGTCGCGCTCATCGATACCGCAGATAATACG
C10539-FW	CTGGAGAAAAGCAGCGGAGGGCGGCTGGGCGTCGCGCTCATCGATACCGCAGATAATACG
C10537-FW	CTGGAGAAAAGCAGCGGAGGGCGGCTGGGCGTCGCGCTCATCGATACCGCAGATAATACG

C10536-FW	CAGGTGCTTTATCGCGGTGATGAACGCTTTCCAATGTGCAGTACCAGTAAAGTTATGGCG
C10524-FW	CAGGTGCTTTATCGCGGTGATGAACGCTTTCCAATGTGCAGTACCAGTAAAGTTATGGCG
C10539-FW	CAGGTGCTTTATCGCGGTGATGAACGCTTTCCAATGTGCAGTACCAGTAAAGTTATGGCG
C10537-FW	CAGGTGCTTTATCGCGGTGATGAACGCTTTCCAATGTGCAGTACCAGTAAAGTTATGGCG

C10536-FW	GCCGCGGCGGTGCTTAAGCAGAGTGAAACGCAAAAGCAGCTGCTTAATCAGCCTGTCGAG
C10524-FW	GCCGCGGCGGTGCTTAAGCAGAGTGAAACGCAAAAGCAGCTGCTTAATCAGCCTGTCGAG
C10539-FW	GCCGCGGCGGTGCTTAAGCAGAGTGAAACGCAAAAGCAGCTGCTTAATCAGCCTGTCGAG
C10537-FW	GCCGCGGCGGTGCTTAAGCAGAGTGAAACGCAAAAGCAGCTGCTTAATCAGCCTGTCGAG

C10536-FW	ATCAAGCCTGCCGATCTGGTTAACTACAATCCGATTGCCGAAAAACACGTCAACGGCACA
C10524-FW	ATCAAGCCTGCCGATCTGGTTAACTACAATCCGATTGCCGAAAAACACGTCAACGGCACA
C10539-FW	ATCAAGCCTGCCGATCTGGTTAACTACAATCCGATTGCCGAAAAACACGTCAACGGCACA
C10537-FW	ATCAAGCCTGCCGATCTGGTTAACTACAATCCGATTGCCGAAAAACACGTCAACGGCACA

C10536-FW	ATGACGCTGGCAGAACTGAGCGCGGCCGCGTTGCAGTACAGCGACAATACCGCCATGAAC
C10524-FW	ATGACGCTGGCAGAACTGAGCGCGGCCGCGTTGCAGTACAGCGACAATACCGCCATGAAC
C10539-FW	ATGACGCTGGCAGAACTGAGCGCGGCCGCGTTGCAGTACAGCGACAATACCGCCATGAAC
C10537-FW	ATGACGCTGGCAGAACTGAGCGCGGCCGCGTTGCAGTACAGCGACAATACCGCCATGAAC

C10536-FW	AAATTGATTGCCAGCTCGGTGGCCCGGGAGGCGTGACGGCTTTTGCCCGCGCGATCGGC
C10524-FW	AAATTGATTGCCAGCTCGGTGGCCCGGGAGGCGTGACGGCTTTTGCCCGCGCGATCGGC
C10539-FW	AAATTGATTGCCAGCTCGGTGGCCCGGGAGGCGTGACGGCTTTTGCCCGCGCGATCGGC
C10537-FW	AAATTGATTGCCAGCTCGGTGGCCCGGGAGGCGTGACGGCTTTTGCCCGCGCGATCGGC

C10536-FW	GATGAGACGTTTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGAATACCGCCATTCCCGGCGAC
C10524-FW	GATGAGACGTTTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGAATACCGCCATTCCCGGCGAC
C10539-FW	GATGAGACGTTTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGAATACCGCCATTCCCGGCGAC
C10537-FW	GATGAGACGTTTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGAATACCGCCATTCCCGGCGAC

C10536-FW	CCGAGAGACACCACCGCCGCGGGCGATGGCGCAGACGTTGCGTCAGCTTACGCTGGGT
C10524-FW	CCGAGAGACACCACCGCCGCGGGCGATGGCGCAGACGTTGCGTCAGCTTACGCTGGGT
C10539-FW	CCGAGAGACACCACCGCCGCGGGCGATGGCGCAGACGTTGCGTCAGCTTACGCTGGGT
C10537-FW	CCGAGAGACACCACCGCCGCGGGCGATGGCGCAGACGTTGCGTCAGCTTACGCTGGGT

```

C10536-FW      CATGCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGCGCAGTTGGTGACGTGGCTCAAAGGCAATACGACC
C10524-FW      CATGCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGCGCAGTTGGTGACGTGGCTCAAAGGCAATACGACC
C10539-FW      CATGCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGCGCAGTTGGTGACGTGGCTCAAAGGCAATACGACC
C10537-FW      CATGCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGCGCAGTTGGTGACGTGGCTCAAAGGCAATACGACC
                *****

C10536-FW      GGCGCAGCCAGCATTCGGGCCGGCTTACCGACGTCGTGGACTGTGGGTGATAAGACCGGC
C10524-FW      GGCGCAGCCAGCATTCGGGCCGGCTTACCGACGTCGTGGACTGTGGGTGATAAGACCGGC
C10539-FW      GGCGCAGCCAGCATTCGGGCCGGCTTACCGACGTCGTGGACTGTGGGTGATAAGACCGGC
C10537-FW      GGCGCAGCCAGCATTCGGGCCGGCTTACCGACGTCGTGGACTGTGGGTGATAAGACCGGC
                *****

C10536-FW      AGCGGCGACTACGGCACCACCAATGATATTGCGGTGATCTGGCCGCAGGGTCGTGCGCCG
C10524-FW      AGCGGCGACTACGGCACCACCAATGATATTGCGGTGATCTGGCCGCAGGGTCGTGCGCCG
C10539-FW      AGCGGCGACTACGGCACCACCAATGATATTGCGGTGATCTGGCCGCAGGGTCGTGCGCCG
C10537-FW      AGCGGCGACTACGGCACCACCAATGATATTGCGGTGATCTGGCCGCAGGGTCGTGCGCCG
                *****

C10536-FW      CTGGTTCTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAACAGAACGCAGAGAGCGCC
C10524-FW      CTGGTTCTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAACAGAACGCAGAGAGCGCG
C10539-FW      CTGGTTCTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAACAGAACGCAGAGAGCCCC
C10537-FW      CTGGTTCTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAACAGAACGCAGAGAGCCCC
                *****

```

A continuación, se comparó esta secuencia con la base de datos y se obtuvo como resultado que la secuencia estudiada correspondía, como cabía esperar a una *bla*_{CTX-M} del grupo 9, y en concreto a la variante alélica *bla*_{CTX-M-14}. En la figura siguiente se presenta la comparación de la secuencia nucleotídica de nuestras cepas con la de la secuencia estándar *bla*_{CTX-M-14} contenida en el banco de genes (NCBI).

Figura 12. Comparación de la secuencia problema con la secuencia del gen *bla*_{CTX-M-14}

```

C10536      1  CGGCGGCGTGCAATCCGCTGCTGCTGGGCAGCGCGCCGCTTTATGCGCAGACGAGTGCGG      60
                |||
Sbjct      38  CGGCGGCGTGCAATCCGCTGCTGCTGGGCAGCGCGCCGCTTTATGCGCAGACGAGTGCGG      97

C10536     61  TGCAGCAAAAGCTGGCGGCGCTGGAGAAAAGCAGCGGAGGGCGGCTGGGCGTCGCGCTCA     120
                |||
Sbjct     98  TGCAGCAAAAGCTGGCGGCGCTGGAGAAAAGCAGCGGAGGGCGGCTGGGCGTCGCGCTCA     157

C10536    121  TCGATACCGCAGATAATACGCAGGTGCTTTATCGCGGTGATGAACGCTTTCCAATGTGCA     180
                |||
Sbjct    158  TCGATACCGCAGATAATACGCAGGTGCTTTATCGCGGTGATGAACGCTTTCCAATGTGCA     217

C10536    181  GTACCAGTAAAGTTATGGCGGCCGCGGCGGTGCTTAAGCAGAGTGAAACGCAAAAGCAGC     240
                |||
Sbjct    218  GTACCAGTAAAGTTATGGCGGCCGCGGCGGTGCTTAAGCAGAGTGAAACGCAAAAGCAGC     277

```

```

C10536 241 TGCTTAATCAGCCTGTCGAGATCAAGCCTGCCGATCTGGTTAACTACAATCCGATTGCCG 300
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 278 TGCTTAATCAGCCTGTCGAGATCAAGCCTGCCGATCTGGTTAACTACAATCCGATTGCCG 337

C10536 301 AAAAACACGTCAACGGCACAATGACGCTGGCAGAACTGAGCGCGGCCGCGTTGCAGTACA 360
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 338 AAAAACACGTCAACGGCACAATGACGCTGGCAGAACTGAGCGCGGCCGCGTTGCAGTACA 397

C10536 361 GCGACAATACCGCCATGAACAAATTGATTGCCCAGCTCGGTGGCCCGGGAGGCGTGACGG 420
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 398 GCGACAATACCGCCATGAACAAATTGATTGCCCAGCTCGGTGGCCCGGGAGGCGTGACGG 457

C10536 421 CTTTGGCCGCGCGATCGGCGATGAGACGTTTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGA 480
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 458 CTTTGGCCGCGCGATCGGCGATGAGACGTTTCGTCTGGATCGCACTGAACCTACGCTGA 517

C10536 481 ATACCGCCATTCCCGGCGACCCGAGAGACACCACCACGCCGCGGGCGATGGCGCAGACGT 540
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 518 ATACCGCCATTCCCGGCGACCCGAGAGACACCACCACGCCGCGGGCGATGGCGCAGACGT 577

C10536 541 TGCGTCAGCTTACGCTGGGTGTCATGCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGCGCAGTTGGTGACGT 600
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 578 TGCGTCAGCTTACGCTGGGTGTCATGCGCTGGGCGAAACCCAGCGGGCGCAGTTGGTGACGT 637

C10536 601 GGCTCAAAGGCAATACGACCGGCGCAGCCAGCATTCTGGGCCGGCTTACCGACGTCGTGGA 660
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 638 GGCTCAAAGGCAATACGACCGGCGCAGCCAGCATTCTGGGCCGGCTTACCGACGTCGTGGA 697

C10536 661 CTGTGGGTGATAAGACCGGCAGCGGCGACTACGGCACCACCAATGATATTGCGGTGATCT 720
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 698 CTGTGGGTGATAAGACCGGCAGCGGCGACTACGGCACCACCAATGATATTGCGGTGATCT 757

C10536 721 GGCCGCGAGGGTCGTGCGCCGCTGGTTCTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAACAGAACG 780
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 758 GGCCGCGAGGGTCGTGCGCCGCTGGTTCTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAACAGAACG 817

C10536 781 CAGAGAGC 788
          |||||||
Sbjct 818 CAGAGAGC 825

```

En conclusión, se puede afirmar que todas las cepas de *E. coli* BLEE-positivas de este trabajo son portadoras del gen codificante de BLEE denominado *bla*_{CTX-M-14}, y que codifica la enzima CTX-M-14.

6.3.3. Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a colistina en las cepas BLEE positivas.

Durante el estudio de la sensibilidad de los distintos antibióticos en agar, se estudió entre otros la colistina, antibiótico muy importante en el ámbito de la ganadería y con gran interés biomédico.

Puesto que los resultados de sensibilidad obtenidos por antibiograma para la colistina deben ser corroborados por estudio de la CMI, se determinó dicha CMI a colistina en todas las cepas BLEE-positivas del estudio y se pudo comprobar que todas ellas (menos una, 317/C10524) tenían una CMI para este antibiótico superior a 4 µg/ml, es decir, fenotípicamente eran resistentes a este antibiótico (según criterios CLSI 2018). Por ello, se procedió a realizar una técnica de PCR-específica para detectar la presencia del gen de resistencia emergente *mcr-1*, descrito por primera vez en China en 2016 (Liu et al., 2016).

En la *Figura 13* se presentan los resultados de la PCR del gen *mcr-1* en las 12 cepas BLEE-positivas. Como se puede observar, en 8 de las 12 cepas testadas se pudo amplificar por PCR el gen *mcr-1*, todas ellas fenotípicamente resistentes a colistina. Sin embargo, *mcr-1* no fue detectado por PCR en 4 de las cepas BLEE-positivas (3 de ellas fenotípicamente resistentes al antibiótico y otra sensible). Quedaría pendiente de estudiar en el futuro otros genes *mcr* descritos muy recientemente en la literatura, en las cepas colistina-R/*mcr-1* negativas. El producto de PCR de *mcr-1* obtenido por PCR fue posteriormente verificado mediante secuenciación, verificándose que correspondía a dicha variante alélica sin mutaciones respecto a la contenida en la base de genes del NCBI.

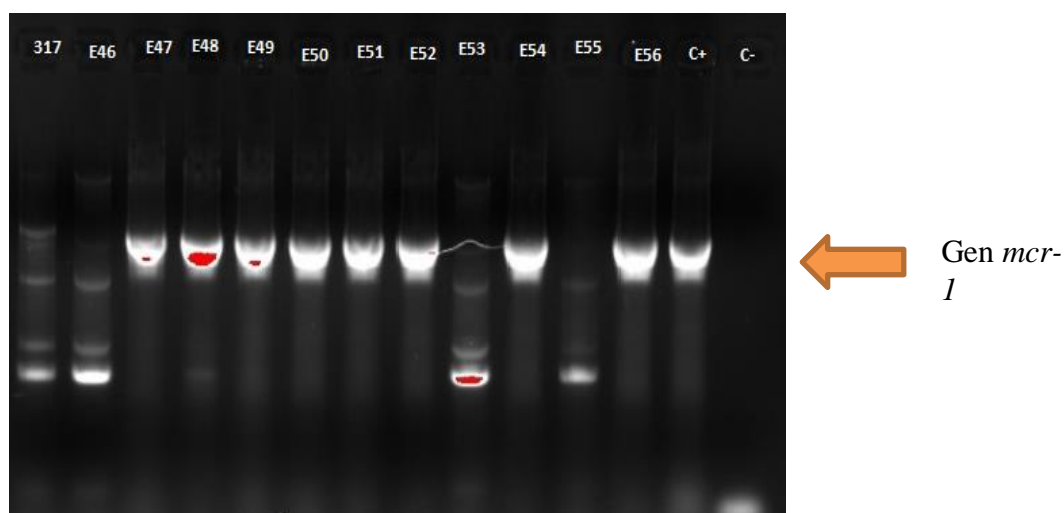


Figura 13. Resultados de la técnica de PCR para el gen *mcr-1* con las cepas BLEE positivas

Tabla 11. Resultados del estudio fenotípico y genotípico de resistencia a colistina en las cepas BLEE-positivas

Cepas UR	Presencia/ausencia del gen <i>mrc-1</i>	Valores CMI	Resistencia/Sensibilidad
C10524	Ausencia	≤ 2	Sensible
C10532	Ausencia	≥ 4	Resistente
C10533	Presencia	≥ 4	Resistente
C10534	Presencia	≥ 4	Resistente
C10535	Presencia	≥ 4	Resistente
C10536	Presencia	≥ 4	Resistente
C10537	Presencia	≥ 4	Resistente
C10538	Presencia	≥ 4	Resistente
C10539	Ausencia	≥ 4	Resistente
C10540	Presencia	≥ 4	Resistente
C10541	Ausencia	≥ 4	Resistente
X60	Presencia	≥ 4	Resistente

6.4. Identificación de los grupos filogenéticos de las cepas BLEE--positivas

El grupo filogenético fue determinado en las doce cepas BLEE-positivas, y se demostró por PCR que todas ellas pertenecían al grupo filogenético B1, al carecer todos del gen *chuaA* y ser positivos para el gen *TSPE 4.C2*.

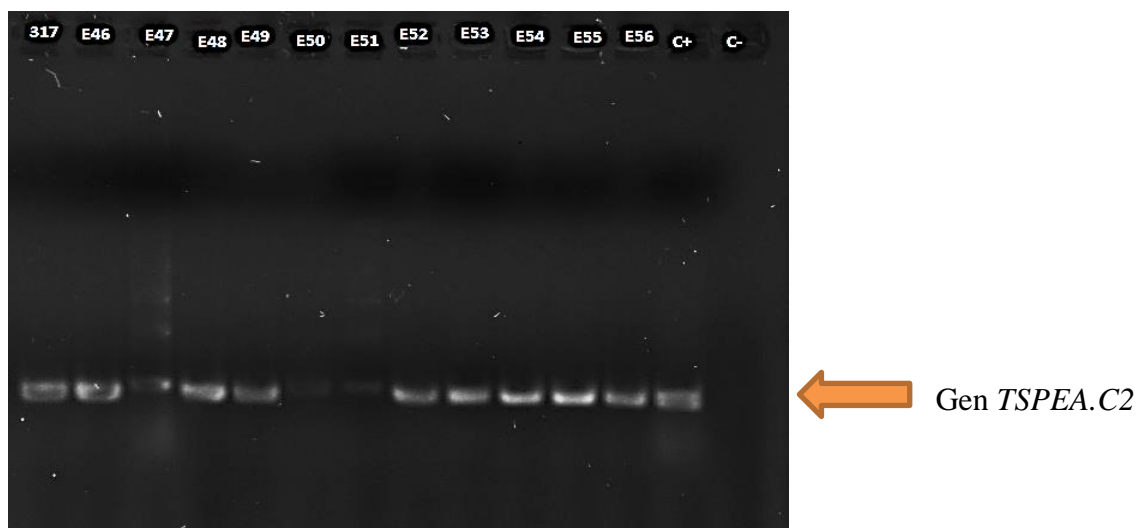


Figura 14. Resultados de la PCR para el gen *chuaA*

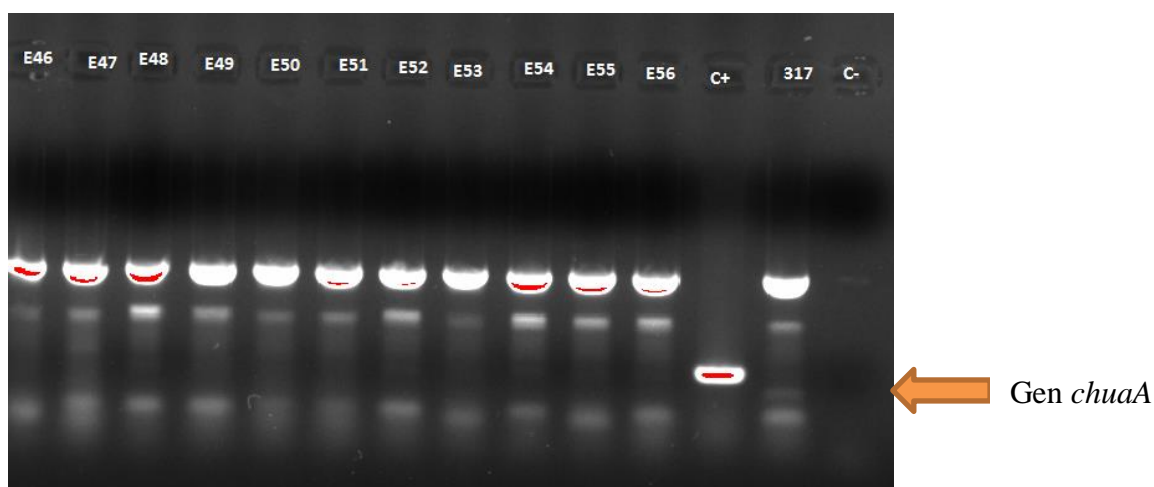


Figura 15. Resultados de PCR para el gen *TSPE4.C2*

Por consiguiente, se puede concluir en relación a las 12 cepas BLEE-positivas:

1. que todas ellas contienen el gen *bla*_{CTX-M-14} detectado por PCR y secuenciación y pertenecen al grupo filogenético B1.
2. que 11 de las 12 cepas son resistentes a colistina (CMI >4 µg/ml) y albergan el gen emergente de resistencia *mcr-1*
3. que hay 3 cepas que son resistentes a colistina, pero carecen de *mcr-1*, lo que abre la puerta a otros posibles mecanismos de resistencia.

En la *Tabla 12* se presenta de forma resumida todos los datos obtenidos para las cepas BLEE positivas.

Tabla 12. Recopilación de los resultados para las cepas estudiadas

Cepas UR	Fenotipo R	Fenotipo BLEE	Gen BLEE	Gen de resistencia colistina	Grupo Filogenético
C10524	TET-CIP-GEN-STR	+	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	Ausencia	B1
C10532	TET-CHL-SXT-COL	+	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	Ausencia	B1
C10533	TET- CHL -SXT-COL	+	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>mcr-1</i>	B1
C10534	TET-CHL-SXT-COL	+	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>mcr-1</i>	B1
C10535	TET- CHL -SXT-COL	+	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>mcr-1</i>	B1
C10536	TET- CHL -SXT-STR-COL	+	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	Ausencia	B1
C10537	TET- CHL-SXT-GEN-COL	+	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>mcr-1</i>	B1
C10538	TET- CHL-SXT-COL	+	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>mcr-1</i>	B1
C10539	TET-CHL -SXT-CIP-COL	+	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>mcr-1</i>	B1
C10540	TET- CHL-SXT-GEN-STR-COL	+	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>mcr-1</i>	B1
C10541	TET- CHL-SXT-CIP-STR-COL	+	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	Ausencia	B1
X60	TET-CHL-SXT-COL	+	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>mcr-1</i>	B1

7. DISCUSIÓN

Escherichia. coli es la bacteria analizada en este estudio, y es de gran importancia debido a su común contacto con los seres vivos de sangre caliente, ya que se encuentra hospedada en su intestino, tanto de los animales como de los seres humanos. Esta enterobacteria forma parte de su microbiota intestinal, la cual es muy abundante y diversa. Se les llama bacterias comensales, ya que la mayor parte de ellas no son patógenas cuando se encuentran en su hábitat, y a través de las heces pueden pasar al ambiente, contaminar alimentos, etc. Por otro lado, *E. coli* puede ser responsable de muchas infecciones como patógeno oportunista (especialmente en personas con las defensas disminuidas o cuando escapa a las barreras de protección del organismo) y también hay una minoría de cepas que son especialmente virulentas y patógenas por poseer genes específicos de virulencia, como es el caso de los relacionados con la toxina shiga (Alonso *et al.*, 2017a).

Durante mucho tiempo ha existido un interés por conocer la epidemiología de *E. coli* a nivel hospitalario y los mecanismos de resistencia que portan dichas cepas responsables de infecciones. En los últimos años, esta preocupación se ha extendido a las cepas de *E. coli* procedentes de animales de granja o de los alimentos derivados de los mismos. Se ha puesto de manifiesto las posibles rutas de diseminación de bacterias resistentes a antibióticos como son los alimentos, el agua, el suelo y más recientemente se ha postulado que el aire podría ser también un vehículo de transferencia. En este sentido, estudios anteriores del grupo de investigación en el que se ha realizado este TFG pusieron de manifiesto la presencia de bacterias resistentes en aire y lodos de granjas de vacuno (Navajas-Benito *et al.* 2017; Sanz S, *et al.* 2015).

Como ya se ha mencionado, en los últimos años la resistencia a los antibióticos ha alcanzado dimensiones preocupantes. Esta resistencia no solo afecta a bacterias patógenas sino, también a las bacterias comensales. Estas, y principalmente las que se encuentran en la microbiota intestinal, como es el caso de *E. coli*, pueden entrar en contacto con los antibióticos cuando estos son consumidos, especialmente por vía oral, y se pueden favorecer la emergencia de bacterias resistentes a los mismos que pueden ser posteriormente transferidos al ambiente a través de las heces. En este sentido, los antibióticos cuando son ingeridos ejercen una presión selectiva sobre la microbiota intestinal y pueden provocar un desequilibrio bacteriano, favoreciendo las especies más resistentes y también seleccionando aquellas cepas de la especie con mecanismos de

resistencia específicos. De esta manera la microbiota intestinal se ve muy afectada, este hecho es grave pero no será tanto si las bacterias afectadas no fueran capaces de transmitir esa información genética. La situación se hace preocupante al comprobar como las distintas bacterias pueden transmitir esa información genética, de un animal a otro y por distintas vías, como es la carne, las heces, el suelo, agua, aire, etc. provocando una gran propagación de los genes de resistencia (Torres, 2007).

Este es el tema que aborda este trabajo, en el que se intenta determinar la frecuencia de resistencia a antibióticos en las cepas de *E. coli* procedentes de aire y lodos de granjas de porcino de La Rioja, y asimismo determinar si estas cepas pueden albergar mecanismos de resistencia emergentes y de gran interés en clínica humana como es el caso de las BLEEs o el gen *mcr-1* asociado con la resistencia a la colistina. Ambos tipos de resistencia son muy relevantes en medicina humana ya que afecta a antibióticos de gran utilidad para el tratamiento de infecciones, y que serían invalidados en el caso de la presencia de dichos mecanismos.

Sobre el aire como posible vía de transmisión de estos genes de resistencia, no se han encontrado muchos estudios, pero hay que tenerla en cuenta para estudios futuros. Ya que esta transmisión implicaría distintas medidas de precaución. (Reuland *et al.*, 2016; Sanz *et al.*, 2015; Dohmen *et al.*, 2017).

En este trabajo se estudian 38 cepas aisladas previamente en muestras ambientales (aire y lodos), de dos granjas porcinas correspondientes a distintas zonas de la granja (Sanz *et al.*, en revisión). Todas ellas se identificaron previamente como *E. coli*, aunque fueron reidentificadas en este TFG, para descartar posibles contaminaciones, que no existieron. Como ya se ha mencionado, esta bacteria es comensal de la microbiota intestinal de animales de sangre caliente, como es el caso de los cerdos, por lo que es normal su abundancia en el medio donde se encuentran estos animales, especialmente en momentos de gran movimiento de los animales.

Se realizó el estudio fenotípico de distintos tipos de antibióticos en las 38 cepas aisladas. Es destacable el alto porcentaje de cepas que expresaban un fenotipo de multiresistencia (68%), siendo especialmente elevados los niveles de resistencia para ampicilina, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol (60-70% de las cepas estudiadas). Los beta-lactámicos y la tetraciclina son ampliamente utilizados en porcino y esta puede ser una razón de los altos niveles de resistencia detectados. Solamente en 13 de las cepas fueron sensibles a todos los antibióticos testados. Si se comparan estos datos con los de cepas de *E. coli* procedentes de aire de granjas de vacuno de la Rioja (Navajas-

Benito *et al.*, 2017), los niveles de resistencia son muy superiores en el caso del porcino (para vacuno los porcentajes fueron inferiores al 18% para todos los antibióticos testados). Estudios llevados a cabo por otros grupos en cepas de *E. coli* de granjas de porcino o de aves también fueron detectado altos niveles de resistencia (Chantziaras *et al.* 2014).

Un dato muy relevante obtenido en este trabajo ha sido que un tercio de las cepas aisladas eran fenotípicamente productoras de BLEEs, y que tras secuenciación se ha determinado que contenían el gen *bla*_{CTX-M-14}, variante alélica de las CTX-M del grupo 9. Además, cuando se estudió el filogrupo, se observó que todas ellas pertenecían al grupo filogenético B1. Este tipo de BLEE ha sido más frecuentemente asociado con cepas de *E. coli* procedentes de aves de granja, siendo las CTX-M del grupo 1 más frecuentes en porcino (Torres and Zarazaga, 2007). Cabe asimismo mencionar que en la mayoría de las referencias encontradas en las que se estudia la existencia de cepas BLEE en aire de granjas porcinas, este tipo de enzimas pertenecen al grupo CTX-M-1, y en un reciente estudio llevado a cabo en Alemania se trataba de la variante CTX-M-15 (García-Cobos *et al.*, 2015)

Sería muy interesante realizar en paralelo un estudio de *E. coli* en humanos que se encuentren en contacto más directo con dichas granjas, para poder observar la relación entre los aislados de *E. coli* de animales y humanos. Observando otros estudios, se comprobó que hay una relación muy interesante entre las BLEE detectadas en seres humanos y las de los animales consumidos o en contacto con ellos. En España predominan a nivel clínico las enzimas CTX-M del grupo 9, principalmente CTX-M-9 y CTX-M-14, estas también son predominantes en animales de consumo en este país, aunque en cerdo las más frecuente es la CTX-M-1. (Torres and Zarazaga, 2007).

El siguiente objetivo del trabajo fue determinar si entre las cepas BLEE-positivas podría haber cepas resistentes a colistina, portadoras de genes de resistencia emergentes desde 2016, como es el caso de *mcr-1*. (Liu *et al.*, 2016). Hay que tener en cuenta que la colistina es un antibiótico que se usó en humanos en la década de los 60 pero que se dejó de usar por su toxicidad. En los últimos años ha reemergido su uso en humanos para el tratamiento de bacterias multirresistentes, para lo cual se han modificado las pautas de utilización para reducir dicha toxicidad. Sin embargo, este antibiótico se ha usado en el pasado en animales y en la actualidad aún se usa en cerdos

en tratamientos con colistina para el posparto de distintas hembras. En 2015 se detectaron las primeras cepas de *E. coli* portadoras de mecanismos de resistencia ligados a plásmidos y por tanto de carácter transferible. En concreto se describió el gen *mcr-1* en China (Liu *et al.*, 2016), y en los 3 últimos años se han descrito otras variantes de *mcr* más minoritarias, como como *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5* (García *et al.*, 2018).

Fue nuestra sorpresa detectar que 11 de las 12 cepas que expresaban una BLEE de tipo CTX-M-14 positivas eran resistentes a la colistina y que 7 de ellas albergaban el gen *mcr-1*. Es interesante señalar que se detectaron 3 cepas colistina-resistentes y *mcr-1* negativas. En un futuro habría que determinar si estas cepas son portadoras de los genes *mcr* minoritarios anteriormente mencionados o si podían albergar nuevas variantes aún no descritas. Estos aspectos serán analizados en el futuro, pero abren nuevas perspectivas de investigación.

Las cepas CTX-M-14 y *mcr-1* positivas presentaban un fenotipo MDR que incluía además de β -lactámicos y colistina, también resistencia a la tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, y otros antibióticos para algunas de las cepas. Esto pone de manifiesto la diseminación de cepas con mecanismos de resistencia a antibióticos relevantes a nivel clínico, en el ambiente de las granjas, siendo un aspecto importante en seguridad alimentaria y en ecología ambiental.

Finalmente, también se determinó el grupo filogenético de las 12 cepas anteriores, todas ellas pertenecían al grupo B1. Las cepas del grupo filogenético B2 y D se asocian más a procesos infecciosos extraintestinales y las de los grupos filogenéticos A y B1 son más frecuentes entre cepas comensales, como son las analizadas en este estudio

Analizando en las cepas BLEEs el fenotipo, genotipo y los datos del grupo filogenético, se puede pensar que las 12 cepas estudiadas podrían tener relación clonal. No obstante, también es posible que correspondan a diferentes líneas genéticas teniendo en cuenta la diferente sensibilidad a colistina y presencia de *mcr-1* en dichas cepas. No obstante, también es posible que se trate de la misma línea genética y que unas tengan un plásmido portador de *mcr-1* y las otras carezcan del mismo. Este aspecto será evaluado en un futuro.

8. CONCLUSIÓN

1. *E. coli* es un microorganismo frecuente en aire y lodos de granjas porcinas.
2. Se detecta altos niveles de resistencia a ampicilina, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol (65%), antibióticos muy utilizados en ganado porcino.
3. Mas del 60% de las cepas estudiadas presentaron un fenotipo de multi-resistencia, es decir, resistencia a antibióticos de más de tres familias diferentes.
4. El 31,5% de las cepas del estudio presentaron un fenotipo BLEE, y portaban el gen codificante de la enzima CTX-M-14.
5. Todas las cepas CTX-M-14 positivas, menos una, presentaron resistencia a colistina, con una CMI ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$, y 7 de ellas contenían el gen *mcr-I*.
6. La existencia de cepas resistentes a colistina y carentes de *mcr-I*, plantea estudios futuros para poder determinar si pudieran poseer variantes alélicas infrecuentes de *mcr* o mecanismos nuevos de resistencia.
7. Todas las cepas fueron tipadas dentro del grupo filogenético B1, normalmente asociado a cepas comensales.
8. Los datos sugieren que las cepas BLEE-positivas poseen una relación clonal, sin embargo, es posible que posean diferente contenido plasmídico que justifique la presencia o ausencia del gen *mcr-I*.
9. El aire es un vehículo de transferencia de bacterias comensales a tener en cuenta, medio que debería ser monitorizado en el futuro para poder establecer las estrategias adecuadas de control.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alcalá L, Alonso CA, Simón C, González-Esteban C, Orós J, Rezusta A, Ortega C, Torres C. 2016. Wild Birds, Frequent Carriers of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 Types. *Microbial Ecology*, 72:861-869.
2. Alonso CA, Mora A, Díaz D, Blanco M, González-Barrio D, Ruiz-Fons F, Simón C, Blanco J, Torres C. 2017a. Occurrence and characterization of *stx* and/or *eae*-positive *Escherichia coli* isolated from wildlife, including a typical EPEC strain from a wild boar. *Veterinary Microbiology*, 207:69-73.
3. Alonso CA, Zarazaga M, Ben Sallem R, Jouini A, Ben Slama K, Torres C. 2017b. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* in husbandry animals: the African perspective. *Letters Applied Microbiology*. 2017 May; 64:318-334.
4. Ambler R.P. 1980. The Structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.*, 289:321-331.
5. Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Handley FA, Stallwood AD, Davis RH, Liebana E. 2005. *bla*(CTX-M) genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49:1319-1322.
6. Ben Sallem R, Ben Slama K, Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Estepa V, Jouini A, Gharsa H, Klibi N, Boudabous A, Torres C. 2012. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. *Foodborne Pathogens Diseases*, 9:1137-42.
7. Ben Said L, Jouini A, Klibi N, Dziri R, Alonso CA, Boudabous A, Ben Slama K, Torres C. 2015. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *International Journal Food Microbiology* 203:86-92.
8. Bevan ER, Jones A.M, Hawkey PM. 2017. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 1: 1-11.
9. Brush K, Jacoby G.A. 2010. Updated functional classification of beta-lactamase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 54:969-976.
10. Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B. 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 38:7-9.
11. Chantziaras I, Boyen2 F, Callens B, Dewulf J. 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 69:827-834.
12. Clermont O, Bonacosi S, Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied Environmental Microbiology*, 66:4555-4558.
13. Coque T, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:500-501.
14. D'Andrea MM, Arenaa F, Pallecchia L, Rossolinia G.M. 2013. CTX-M-type- β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303:305-317.

15. **Decuype L, Deketelaere S, Vanparys L, Jukic M, Sosic I, Sauvage E, Amoroso AM, Verlaine O, Joris B, Gobec S, D'hooghe M.** 2018. In silico design and enantioselective synthesis of functionalized monocyclic 3-amino-1-carboxymethyl- β -lactams as inhibitors of penicillin-binding proteins of resistant bacteria. *European Journal of Chemistry*, 10:1-19.
16. **Dohmen V, Schmitt H, Bonten M, Heedeik D.** 2017. Air exposure as a possible route for ESBL in pig farmers. *Environmental Research*, 155:359-364.
17. **Drawz S, Bonomo R A.** 2010. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23:160-201.
18. **García-Cobos S, Köck R, Mellmann A, Frenzel J, Friedrich AW, Rossen J.W.A.** 2015. Molecular Typing of Enterobacteriaceae from Pig Holdings in North-Western Germany Reveals Extended- Spectrum and AmpC β -Lactamases Producing but no Carbapenem Resistant Ones. *Public Librery of Science*, 1-12.
19. **García V, García-Meniño I, Mora A, Flament-Simon SC, Díaz-Jiménez D, Blanco JE, Alonso MP, Blanco J.** 2018. Co-occurrence of mcr-1, mcr-4 and mcr-5 genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52:104-108.
20. **Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, Cantón R, Walsh TR.** 2009. Redefinig extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 63:1-4.
21. **Kong KF, Schneper L, Mathee K.** 2010. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Scandinavian Socities for Medical Microbiology and Pathology*, 118:1-36.
22. **Luque S, Grau S, Berenguer N, Horcajada JP, Sorlí L, Montero MM, Salas E.** 2011. Luces y sombras en el uso de colistina: falta mucho por conocer. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 29: 287-296.
23. **Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu L.F, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu J.H, Shen J,** 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16:161-168.
24. **Maamar E, Alonso CA, Hamzaoui Z, Dakhli N, Abbassi MS, Ferjani S, Saidani M, Boutiba-Ben Boubaker I, Torres C.** 2018. Emergence of plasmid-mediated colistin-resistance in CMY-2-producing *Escherichia coli* of lineage ST2197 in a Tunisian poultry farm. *International Journal Food Microbiology*. 23;269:60-63.
25. **Navajas-Benito EV, Alonso CA, Sanz S, Olarte C, Martínez-Olarte R, Hidalgo-Sanz S, Somalo S, Torres C.** 2016. Molecular characterization of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains from a dairy cattle farm and its surroundings. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1):362-365.
26. **Pegani L, Dell'Amico E, Miglivacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, Romero GM.** 2003. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from hospital in northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:4264-4269.
27. **Pitout J.D, Thomson K.S, Hanson N.D, Ehrhardt A.F, Moland E.S, Sanders C.C.** 1998. β -Lactamases Responsible for Resistance to expanded-Spectrum Cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* Isolates Recovered in South Africa. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 42:1350-1354.
28. **Reuland E.A, Al Naiemi N, Kaiser A.M.** 2016. Prevalence and risk factors for carriage of ESBL-producing enterobacteriaceae in Amsterdam. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 71:1076–1082.

29. **Riaño I, García-Campello M, Sáenz Y, Alvarez P, Vinué L, Lantero M, Moreno MA, Zarazaga M, Torres C.** 2009. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* in Northern Spain with evidence of CTX-M-9 clonal spread among animals and humans. *Clinical Microbiology Infection*, 15:292-5.
30. **Sabate M, Miró E, Navarro F, Vergés C, Aliaga R, Mirelis B.** 2002. Betalactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 49:989-97.
31. **Suárez C, Gudiol F.** 2009. Antibióticos Beta-lactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27:116-129.
32. **Sanz S, Olarte C, Alonso CA, Hidalgo-Sanz R, Gómez P, Ruiz-Ripa L, Torres C.** Identification of bacteria from slurries and air in and around two pork farms. *Food Protection* (sometido para publicación y avanzado estado de revisión).
33. **Sanz S, Olarte C, Martínez-Olarte R, Navajas-Benito EV, Alonso CA, Hidalgo-Sanz S, Somalo S, Torres C.** 2015. Airborne dissemination of *Escherichia coli* in a dairy cattle farm and its environment. *International Journal of Food Microbiology*, 197:40-4.
34. **Spengler B, Kirsch D, Kaufmann R.** 1991. Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1:5-198.
35. **Torres C.** 2007. La resistencia bacteriana a los antibióticos: ¿cuestión de inteligencia o azar? Lección inaugural del curso académico 2007-2008 de la Universidad de La Rioja.
36. **Torres C, Zarazaga M.** 2007. BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(2):29-37.
37. **Valverde A, Coque, T.M, Sánchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R.** 2004. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended spectrum β -actamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:4769-4775.
38. **Vignoli R, Seija V.** Principales mecanismos de Resistencia antibiótica. 35:649-662
39. **Zou D, Huang S, Lei H, Yang Z, Sul Y, Hel X, Zhao O, Wand Y, Liu W, Huang L.** 2017. Sensitive and Rapid Detection of the Plasmid-Encoded Colistin-Resistance Gene *mcr-1* in Enterobacteriaceae Isolates by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Frontiers in Microbiology*, 8:1-7.

Páginas Web

<http://www.dciencia.es/antibioticos/>

<http://www.elsevier.es/en-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-escherichia-coli-klebsiella-pneumoniae-productoras-S0213005X09000755>

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

¹<https://www.webconsultas.com/dieta-y-nutricion/higiene-alimentaria/ecoli-una-bacteria-peligrosa>

<http://www.cresa.cat/blogs/sociedad/es/lus-dantibiotics-a-les-granges-de-porcs-pot-posar-en-perill-la-salut-publica-estudi-de-laparicio-de-resistencies/>

<http://web4.cbm.uam.es/joomla->

[rl/images/Servicios/080.Proteomica/documentos/Espectrometria_de_masas_MALDI-TOF_enero_2015.pdf](http://web4.cbm.uam.es/joomla-rl/images/Servicios/080.Proteomica/documentos/Espectrometria_de_masas_MALDI-TOF_enero_2015.pdf)